



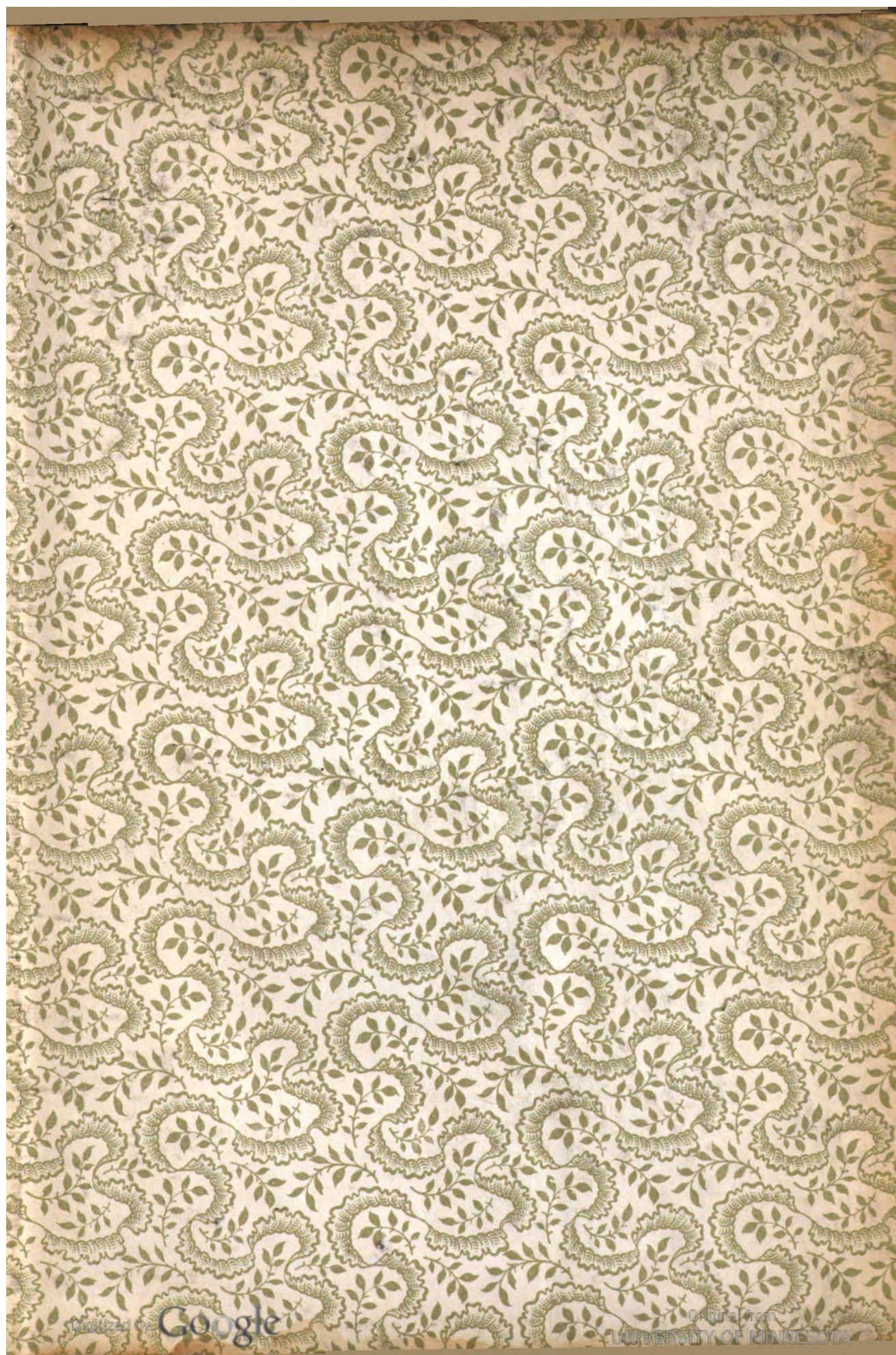
THE LIBRARY OF



CLASS  
BOOK

*Pathology*

















Zeitschrift  
für  
**Immunitätsforschung**  
und experimentelle Therapie  
**I. Teil: Originale**

unter Mitwirkung von :

**H. Apolant**, Frankfurt a. M., **V. Babes**, Bukarest, **O. Bail**, Prag, **E. F. Bashford**, London,  
**A. Besredka**, Paris, **J. Bordet**, Brüssel, **A. Breinl**, Liverpool, **L. Brieger**, Berlin,  
**A. Calmette**, Lille, **R. Doerr**, Wien, **M. Dorset**, Washington, **E. v. Dungern**, Heidelberg,  
**P. Ehrlich**, Frankfurt a. M., **S. Flexner**, New York, **U. Friedemann**, Berlin, **P. Frosch**,  
Berlin, **G. Gaffky**, Berlin, **M. von Gruber**, München, **M. Hahn**, München, **A. Heffter**,  
Berlin, **L. Hektoen**, Chicago, **M. Jacoby**, Berlin, **C. O. Jensen**, Kopenhagen, **S. Kitasato**,  
Tokio, **R. Koch**, Berlin, **W. Kösle**, Bern, **W. Kruse**, Bonn, **K. Landsteiner**, Wien,  
**C. Levaditi**, Paris, **L. von Liebermann**, Budapest, **P. Loeffler**, Greifswald, **Th. Madsen**,  
Kopenhagen, **C. J. Martin**, London, **E. Metschnikoff**, Paris, **L. Michaelis**, Berlin,  
**B. Muir**, Glasgow, **C. Moreschi**, Pavia, **P. Th. Müller**, Graz, **M. Nelsser**, Frankfurt a. M.,  
**F. Neufeld**, Berlin, **F. Nuttall**, Cambridge, **R. Østertag**, Berlin, **R. Paltauf**, Wien,  
**A. Pettersson**, Stockholm, **R. Pfeiffer**, Königsberg i. Pr., **E. P. Pick**, Wien, **P. Römer**,  
Marburg, **C. J. Salomonsen**, Kopenhagen, **A. Schattenfroh**, Wien, **Cl. Schilling**, Berlin,  
**Th. Smith**, Boston, **G. Sobernheim**, Berlin, **V. C. Vaughan**, Ann Arbor, **A. Wassermann**,  
Berlin, **W. Welehardt**, Erlangen, **A. E. Wright**, London, **D. Zabolotny**, St. Petersburg

herausgegeben von :

**E. FRIEDBERGER**      **R. KRAUS**      **H. SACHS**      **P. UHLENHUTH**  
(Berlin.)                      (Wien.)                      (Frankfurt a. M.)      (Gr.-Lichterfelde-Berlin.)

**Erster Band.**

Mit 5 Karten und 22 Kurven, sowie 41 Figuren im Text.



Jena,  
Verlag von Gustav Fischer.  
1909.



Alle Rechte vorbehalten.  
VIA

Pathologie

## Inhaltsverzeichnis.

### Heft 1. (Ausgegeben am 21. Dezember 1908.)

	Seite
<b>Ehrlich, Paul</b> , Zur Einführung . . . . .	1
<b>Levin, Ernst L.</b> , Ueber passive Immunität. Mit 22 Kurven im Text . . . . .	3
<b>Streng, Osv.</b> , Existieren echte Antialexine (Antikomplemente)? . . . . .	28
<b>Petterson, Alfred</b> , Ueber hitzebeständige, alkohollösliche, bakterizide Substanzen der Leukocyten . . . . .	52
<b>Müller, Paul Th.</b> , Einige Versuche über die Rolle der Bakterienlipide bei der Phagocytose . . . . .	61
<b>Roehl, W.</b> , Ueber Trypanosen . . . . .	70
<b>Schwarz, Oswald</b> , Ueber den Einfluß künstlicher Aenderungen im Bakterienprotoplasma auf dessen agglutinogene Fähigkeiten . . . . .	77
<b>Haendel und Schultz, Werner</b> , Beitrag zur Frage der komplement-ableitenden Wirkung der Sera von Scharlachkranken . . . . .	91
<b>Kraus, R., und Schwoner, J.</b> , Ueber Beziehungen der Toxolabilität und Toxostabilität der Antitoxine zu deren Heilwerte . . . . .	103
<b>Uhlenhuth und Manteufel</b> , Chemotherapeutische Versuche mit einigen neueren Atoxypräparaten bei experimentellen Spirochätenkrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Syphilis . . . . .	108
<b>Sachs, Hans, und Rondoni, Pietro</b> , Beiträge zur Theorie und Praxis der Wassermannschen Syphilisreaktion . . . . .	132
<b>v. Eisler, M., und v. Porthelm, M.</b> , Ueber ein Hämagglutinin im Samen von Datura . . . . .	151
<b>Friedberger, E., und Sachs, F.</b> , Ueber die Einwirkung von Arsenpräparaten auf den Verlauf der Lyssainfektion (Virus fixe) beim Kaninchen . . . . .	161

### Heft 2. (Ausgegeben am 27. Januar 1909.)

<b>Römer, Paul H.</b> , Ueber die intestinale Resorption von Serumantitoxin und Milchantitoxin . . . . .	171
<b>Zangger, H.</b> , Die Immunitätsreaktionen als physikalische, speziell als Kolloid-Phänomene . . . . .	193
<b>Wilenko, M.</b> , Ueber Immunisierung mit Kot und über das Verhalten des Inhaltes verschiedener Darmpartieen gegen Kotpräzipitin und Serumpräzipitin. Erste Mitteilung . . . . .	218

119827

NOV 23 1912  
Stechert. I v. 1. 12. 13. 76

	Seite
<b>Fukuhara</b> , Ueber den Zusammenhang alkoholischer (hämolytisch, bakterizid wirkender) Substanzen der Organe mit den normalen und immunisatorisch erzeugten Antikörpern . . . . .	224
<b>Vaughan, Victor C.</b> , Protein Sensitization and its Relation to some of the infectious Diseases. With 5 Charts . . . . .	251
<b>Calmette, A.</b> , Die Tuberkuloseinfektion und die Immunisierung gegen die Tuberkulose durch die Verdauungswege . . . . .	283
<b>von Elsler, M.</b> , Ueber den Zusammenhang der Wertigkeit und Avidität bei Bakterienagglutininen . . . . .	297
<b>Kraus, R., v. Elsler und Fukuhara</b> , Ueber Adsorption des filtrierbaren Virus . . . . .	307
<b>Schatiloff, P., und Isabolinsky, M.</b> , Untersuchungen über die Wassermann-Neisser-Brucksche Reaktion bei Syphilis . . . . .	316
<b>Sellgmann, F.</b> , Zur Kenntnis der Wassermannschen Reaktion . . . . .	340
<b>Teruuchi, Y.</b> , Vergleich der Hämolyse durch Natronlauge und Vibriolysin in verschiedenen isotonischen Medien . . . . .	351

Heft 3. (Ausgegeben am 10. Februar 1909.)

<b>Römer, Paul H.</b> , Ueber das Vorkommen von Tetanusantitoxin im Blute normaler Rinder . . . . .	363
<b>Atkin, E. E.</b> , Spontaneous Agglutination of Horse Erythrocytes suspended in Sodium Chloride Solution. A Contribution to the Haemolytic Technique . . . . .	387
<b>Raubitschek, H., und Russ, V. K.</b> , Ueber entgiftende Eigenschaften der Seife . . . . .	395
<b>Kruschilin, A. W.</b> , Ueber die Wirkung des Alkohols auf die Tätigkeit der Phagocyten . . . . .	407
<b>Stern, Margarete</b> , Eine Vereinfachung und Verfeinerung der serodiagnostischen Syphilisreaktion . . . . .	422
<b>Landsteiner, Karl, und v. Rauchenbichler, Rudolf</b> , Ueber das Verhalten des Staphylolysins beim Erwärmen . . . . .	439

Heft 4. (Ausgegeben am 20. Februar 1909.)

<b>Bashford, E. F., Murray, J. A., und Haaland, M.</b> , Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung. Mit 41 Figuren im Text . . . . .	449
<b>Bail, Oskar, und Tsuda, Kyuzo</b> , Versuche über bakteriolytische Immunkörper mit besonderer Berücksichtigung des normalen Rinderserums . . . . .	546

Heft 5. (Ausgegeben am 11. März 1909.)

<b>Gewin, J.</b> , Zur Frage des Ambozeptorgehaltes des Säuglingsblutes . . . . .	613
<b>Breidl, A., und Nierenstein, M.</b> , Zum Mechanismus der Atoxylwirkung . . . . .	620
<b>Roehl, W.</b> , Heilversuche mit Arsenophenylglycin bei Trypanosomiasis . . . . .	633

## Inhaltsverzeichnis.

V

	Seite
<b>Eisner, Georg</b> , Untersuchungen über die antifermentative, besonders die antitryptische Wirkung des Blutserums . . . . .	650
<b>Pick, E. P.</b> , und <b>Yamanouchi, T.</b> , Chemische und experimentelle Beiträge zum Studium der Anaphylaxie . . . . .	676
<b>Kraus, R.</b> , und <b>Volk, R.</b> , Zur Frage der Serumanaphylaxie . . . .	731
<b>Agazzi, Benedetto</b> , Ueber den Einfluß einiger Arsenpräparate auf die Intensität der Bildung von bakteriellen Antikörpern (Agglutininen) beim Kaninchen . . . . .	736

### Heft 6. (Ausgegeben am 25. März 1909.)

<b>Thomsen, Oluf</b> , Ueber die Spezifität der Serumanaphylaxie und die Möglichkeit ihrer Anwendung in der medikoforensischen Praxis zur Differenzierung von Menschen- und Tierblut (in Blutflecken etc.)	741
<b>Uhlenhuth, P.</b> , Bemerkung zu vorstehender Arbeit von O. Thomsen	770
<b>Ball, Oskar</b> , und <b>Tsuda, Kyuzo</b> , Beobachtungen über die Bindung bakteriolytischer Immunkörper an Vibrionen . . . . .	772

## Autorenverzeichnis.

<b>Agazzi</b> 736. <b>Atkin</b> 387. <b>Bail und Tsuda</b> 546, 772. <b>Bashford, Murray und Haaland</b> 449. <b>Breinl und Nierenstein</b> 620. <b>Calmette</b> 283. <b>Ehrlich</b> 1. <b>Eisler, v.</b> 297. <b>Eisler, v. und v. Portheim</b> 151. <b>Eisner</b> 650. <b>Fukuhara</b> 224. <b>Friedberger und Sachs</b> 161. <b>Gewin</b> 613. <b>Haendel und Schultz</b> 91. <b>Kraus und Schwoner</b> 103. <b>Kraus, v. Eisler und Fukuhara</b> 307. <b>Kraus und Volk</b> 731. <b>Kruschilin</b> 407. <b>Landsteiner und Rauchenbichler</b> 439. <b>Levin</b> 3.	<b>Müller, P. Th.</b> 61. <b>Pettersson</b> 52. <b>Pick und Yamanouchi</b> 676. <b>Raubitschek und Russ</b> 395. <b>Roehl</b> 70, 633. <b>Römer, P.</b> 171, 363. <b>Sachs und Rondoni</b> 132. <b>Schatiloff und Isabolinsky</b> 316. <b>Schwarz</b> 77. <b>Seligmann</b> 340. <b>Stern</b> 422. <b>Streng</b> 28. <b>Teruuchi</b> 351. <b>Thomsen</b> 741. <b>Uhlenhuth</b> 770. <b>Uhlenhuth und Mantenfel</b> 108. <b>Vaughan</b> 251. <b>Wilenko</b> 218. <b>Zangger</b> 193.
---	--





# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. I. No. 1

## Zur Einführung.

Wenn ich in den folgenden Zeilen der „Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie“ einige Geleitworte vorausschicke, so tue ich es mit dem Gefühle einer gewissen Befriedigung darüber, daß ein sowohl in den Problemen, als auch in den Methoden selbständiges Forschungsgebiet ein eigenes, von berufener Seite geleitetes Organ gefunden hat. In dem eigenartigen Entwicklungsgang, den die Immunitätsforschung und die ihr nahe verwandte experimentelle Therapie genommen hat, ist wohl die Ursache dafür zu suchen, daß die in stetiger Zunahme begriffenen Mitteilungen der wissenschaftlichen Ergebnisse immer mehr in den verschiedenartigsten Zeitschriften zerstreut werden, mit deren eigentlichen Disziplinen oft nur ein, historischer oder sehr lockerer Zusammenhang besteht. Die oft beklagte Spezialisierung der medizinischen Literatur ist aber bis zu einem gewissen Grade eine Notwendigkeit, die sich aus dem ins Ungemessene steigenden Material neuer Beobachtung und Forschung auf dem Gesamtgebiete der medizinischen Wissenschaften ergibt. Ein junger Forschungszweig muß dann andererseits an verschiedenen literarischen Stätten, für deren Wahl oft mehr Gründe der Opportunität als der Sachlichkeit maßgebend sind, Unterschlupf finden, bis er so weit erstarkt ist, daß er die von ihm ausgehenden Früchte in einem eigenen Publikationsorgan sammeln und damit seine kraftvolle umfassende Entfaltung auch literarisch zum Ausdruck bringen kann. Dieser Zeitpunkt dürfte aber für die Immunitätsforschung nicht erst jetzt gekommen sein, und in diesem Sinne begrüße ich die Gründung der neuen Zeitschrift, welche eine literarische Zentralstelle für die Fortschritte der Immunitätsforschung und experimentellen Therapie bilden will, als einem fühlbaren Bedürfnis entsprungen, aufs freudigste.

Neben den praktischen Zielen und Methoden waren es die allgemeinen Probleme, welche sehr bald innige Berührungspunkte

der Immunitätslehre mit fast allen biologischen Forschungsgebieten hergestellt haben. Besonders durch das Studium der Antikörper wurde eine ganz neue Art von Lebenserscheinungen und Reaktionen aufgedeckt, deren Analyse nun erst geebnet war, und deren Bedeutung für das physiologische Leben und seine pathologischen Aberrationen offenkundig ist. So erklärt es sich, daß heute die Immunitätsforschung in fast allen medizinischen und naturwissenschaftlichen Disziplinen eine hervorragende Rolle spielt und ihre Methoden zur Lösung wichtiger Fragen überall herangezogen werden.

In richtiger Erkenntnis der nahen Verwandtschaft der Immunitätslehre mit den Problemen der gesamten experimentellen Therapie haben die Herausgeber der neuen Zeitschrift auch diese in reger Entwicklung begriffenen Zweige biologisch-therapeutischer Forschung zum Gegenstande ihres Organs gemacht. Insbesondere die experimentelle Erforschung der Geschwülste und die moderne Chemotherapie sind ja Arbeitsgebiete, die zu einem wesentlichen Anteil aus den Stätten der Immunitätsforschung hervorgegangen sind und so sehr unter gleichen Einflüssen biologisch-methodologischen Denkens stehen, daß ihre Einbeziehung in den Bereich der neuen Zeitschrift nur den natürlichen Verhältnissen Rechnung trägt. Zweifellos handelt es sich um Gebiete, die zu den wichtigsten Zweigen der praktischen und wissenschaftlichen Medizin gehören, und deren von einheitlichen Gesichtspunkten ausgehende verzweigte Fäden hier in zweckmäßiger Weise literarisch zentralisiert werden sollen. Ich bin überzeugt, daß die Bemühungen der Herausgeber und des Verlages einer freudigen Aufnahme seitens der Fachgenossen gewiß sein können, und wünsche dem neuen Organ kraftvolle Entfaltung und glückliches Gedeihen auf seinem jungen Lebenswege. Möge es durch reiche Früchte wissenschaftlicher Forschung ein Dokument für die Fortschritte experimenteller Arbeit und ihrer praktischen Nutzenanwendung sein.

Frankfurt a. M., im November 1908.

P. Ehrlich.



[Aus Statens Seruminstitut in Kopenhagen.]

### Ueber passive Immunität.

Von Dr. med. **Ernst I. Levin**,  
Dozent der Bakteriologie am Karolinischen Institut zu Stockholm.

Mit 22 Kurven im Text.

Schon seitdem Ehrlich zum ersten Male den Unterschied zwischen der aktiven und der passiven Immunisierung aufstellte, ist die erstere Gegenstand einer sehr umfassenden und sorgfältigen Untersuchung gewesen; der passiven Immunisierung hat man dagegen ein bedeutend geringeres Interesse geschenkt, was um so merkwürdiger ist, als diese die Grundlage der praktischen Serotherapie bildet.

Trotzdem wir in dieser eines unserer wirksamsten Mittel zur Bekämpfung der Infektionskrankheiten haben und serotherapeutische Eingriffe in Tausenden und aber Tausenden von Fällen über die ganze Welt hin angestellt werden, ist man doch noch zu keiner allgemein anerkannten Methodik gelangt. Als Ziel kann man wohl dieses angeben, dem Kreislauf des kranken Organismus so schnell wie möglich eine hinreichend hohe Antitoxinkonzentration zuzuführen und diese aufrecht zu erhalten, solange die Krankheit dauert; wie aber dieses Ziel zu erreichen steht, darüber ist man sich nicht einig.

Wenn man die älteste und am besten bekannte Anwendung der Serumtherapie nämlich gegen die Diphtherie ins Auge faßt, so findet man, daß einige Kliniker 1000 IE anwenden, wo andere 10000 empfehlen, daß einige intravenös einspritzen, während der größte Teil sich an die subkutane Applikation hält, daß einige es für zweckmäßig halten, ein für allemal eine sehr große Antitoxinmenge zu geben und die Injektion nicht zu wiederholen, während man anderswo vorzieht, die Eingabe mehrerer kleiner Injektionen beizubehalten u. s. w.

Es ist recht sonderbar, daß die Serumtherapie so alt hat werden können und so allgemein angewendet, ohne daß man

gesucht hat die experimentelle Grundlage für die rationelle Anwendung eines unserer wichtigsten Heilmittel zu beschaffen.

Nach Aufforderung von Herrn Direktor Dr. Th. Madsen habe ich die nachstehenden Versuche ausgeführt, um zur Lösung dieser Probleme einige Beiträge zu gewähren.

#### Method e.

Um einen wirklichen Ueberblick darüber zu erhalten, wie sich das Antitoxin im Organismus verhält, ist es nicht genügend, im Verlauf der Immunisierung einzelne Stichproben zu untersuchen, man ist genötigt, mit so kurzem Zeitintervall wie möglich zahlreiche Bestimmungen vorzunehmen, und man erhält hier den besten Ueberblick dadurch, daß man seine Resultate graphisch überträgt in der Weise, wie dies zuerst von Brieger und Ehrlich unternommen wurde bei ihren bekannten Versuchen über die aktive Immunisierung von Ziegen gegen Tetanus. Nur durch Anwendung einer solchen „kurvenmäßigen“ Anordnung seiner Versuche wird man, wie dies namentlich in den von dem dänischen Seruminstitut ausgegangenen Arbeiten stark hervorgehoben ist, ergiebige Aufschlüsse darüber erhalten können, was in dem aktiv oder passiv immunisierten Organismus vorgeht.

Die Antikörper, welche zu den Versuchen angewendet wurden, waren Antivibriolysin, hergestellt durch Immunisierung von Ziegen mit Vibriolysin, dem von *Vibrio Nasik* produzierten hämolytischen Stoff, sowie Typhus und Coliagglutinin, präpariert durch Injektion an Ziegen oder Kaninchen von Kulturen von *B. coli* und *B. typh.*

Vor und nach der Injektion dieser Antikörper bei den Versuchstieren wurden Blutproben entnommen, bei den Kaninchen aus der Ohrenvene und bei den Ziegen aus der Vena jugularis. Das Serum wurde in einem Eiskeller bei ca. 0° aufbewahrt, bisweilen nachdem ein Tropfen Chloroform hinzugesetzt war, und sämtliche zu einer Kurve gehörenden Sera wurden an demselben Tage mit demselben Blut oder Bakterienkultur bestimmt und sind daher genau komparabel.

Die Messung dieser Antikörper ist mit der hier im Institut gebräuchlichen Technik vorgenommen worden. Rück-

sichtlich des Vibriolysins kann in der Beziehung auf Madsens Darstellung<sup>1)</sup> verwiesen werden.

Das Agglutinin wurde nach der von Jörgensen und Madsen angegebenen Methode<sup>2)</sup> gemessen, mit Zusatz von Agglutinin in mit ca. 20 Proz. fallenden Dosen, zu Kulturen von Typhus- bzw. Coli-Bacillen, getötet durch Zusatz von 0,15-proz. Formalin (Dreyer). Es ist nötig, zu diesen Versuchen einigermaßen hochwertige Antikörper anzuwenden. (Der Titer des Coliagglutinins war 0,0003, des Typhusagglutinins 0,0004 und des Vibriolysins 0,0008.)

Bei der Messung des Agglutinins bin ich verschiedene Male auf die wohlbekannte Erscheinung gestoßen, daß das Resultat der Agglutination mit fallenden Dosen nicht gleichmäßig abnehmend gewesen ist, sondern daß Maxima und Minima<sup>3)</sup> aufgetreten sind.

Diese Erscheinungen, die ja zuvor beschrieben worden sind von einer Reihe von Forschern wie Löffler und Abel, Pfeffer, Neisser, Wechsberg, Dreyer u. a. mehr, sind bekanntlich auf manchen anderen Gebieten wiederzufinden, wie dies von Madsen und Walbum an verschiedenen Hämolyseinen, von Madsen bei Botulismustoxin und dessen Antitoxin und von Biltz bei unorganischen Niederschlägen von kolloider Natur nachgewiesen worden ist.

Selbstredend erschweren solche Unregelmäßigkeiten die Beurteilung einer Messung außerordentlich, und stellt sich heraus, daß Kulturen in einer bestimmten Bouillon diese Unregelmäßigkeiten in besonders hohem Grade ergeben, so

1) Allgemeines über bakterielle Antigene-Toxine, deren Antikörper antitoxische Eigenschaften aufweisen, im Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung.

2) The fate of typhoid and cholera agglutinins during active and passive immunisation. Festschrift bei der Einweihung des staatlichen Serum Instituts 1902 (Kopenhagen).

3) Mir scheint, daß man diese Unregelmäßigkeiten bei der täglichen Ausführung von Widal's Reaktion nicht genügend berücksichtigt hat, und sie deuten in besonderem Grade die Bedeutung davon an, sich bei dieser Bestimmung nicht mit einer einfachen Dosis zu begnügen, sondern sie in mehreren verschiedenen Verdünnungen vorzunehmen. Das Vorkommen dieser Maxima und Minima ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Erklärung dafür, daß einige Untersucher bei starker Verdünnung Agglutination beobachtet haben, bei schwacher Verdünnung aber nicht.

ist am besten, diese als für die Messung unanwendbar zu verwerfen und eine neue zu bereiten. In einigen der nachstehenden Kurven über die Agglutininsschwankungen finden sich sehr große Unregelmäßigkeiten, betreffs welcher es besonders schwierig ist, zu entscheiden, ob sie von wirklichen Schwankungen in der Agglutininmenge oder nur von den angedeuteten Schwierigkeiten beim Messen herrühren.

### Wiederholte intravenöse Injektion von Antikörpern.

Es verbleibt bislang noch unentschieden, wie der Organismus sich verhält, wenn mehrmals nacheinander die gleiche Menge Antikörper in den Kreislauf eingeführt wird.

v. Dungern<sup>1)</sup> glaubte bei Versuchen an Kaninchen mit Plasma von *Maja squinado* gefunden zu haben, daß dieses mit jedem Male, daß es eingespritzt wird, langsamer und langsamer aus der Blutbahn verschwindet.

Andererseits gibt es eine Reihe Forscher [Dehne und Hamburger<sup>2)</sup>, Sacharoff<sup>3)</sup> u. a.], welche gefunden haben, daß bei Tieren, die zuvor einen Antikörper einverleibt erhalten haben, ein neueingeführter Antikörper rascher verschwindet als bei ganz frischen Tieren.

Hier im Institut hat Famulener<sup>4)</sup> ähnliche Versuche wie v. Dungern, aber mit Vibrioantilysin an Ziegen angestellt und gefunden, daß bei 3 aufeinander folgenden Antilysininjektionen in der Schnelligkeit des Fallens kein Unterschied vorhanden war.

Die Frage ist auch von praktischer Bedeutung, um zu ermitteln, wie man am besten eine so lange wie möglich andauernde Antitoxinkonzentration im Blute erzielen kann. Um zur Aufklärung dieser Frage beizutragen, habe ich eine Reihe

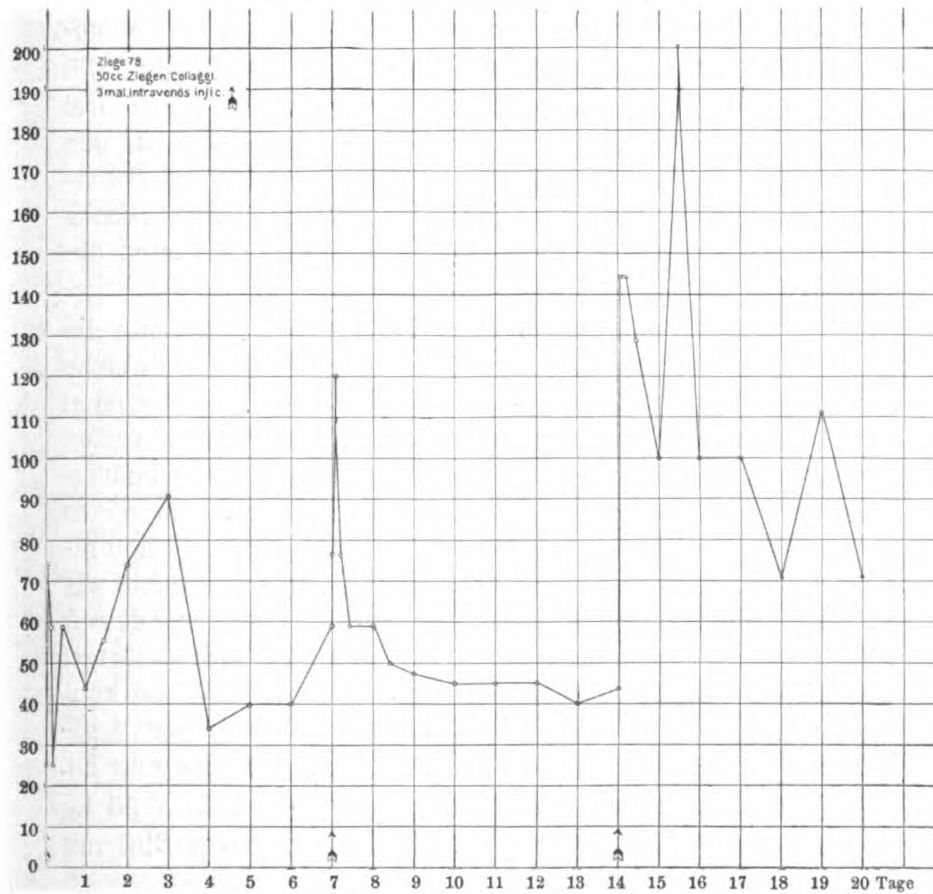
1) v. Dungern, Die Antikörper, Jena 1903.

2) Dehne und Hamburger, Experimentaluntersuchungen über die Folgen parenteraler Einverleibung von Pferdeserum. Wien. klin. Wochenschr., 1904, p. 807.

3) Sacharoff, Ueber Injektionen von Diphtherieantitoxin bei Tieren, welche mit normalem Pferdeserum vorbehandelt waren. Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, p. 99.

4) Famulener, A report of immunisation curves derived from goats treated with certain haemolytic bacterial toxins. Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, p. 58.

Versuche an Ziegen vorgenommen. Hierfür wurden wiederholte Injektionen von Immunserum verschiedener Art, als Coliagglutinin, Typhusagglutinin und Vibrioantilysin, angewendet, alle durch Immunisierung von Ziegen gewonnen. Es handelt sich hier also um ein homologes Serum, wobei ich vorläufig die Frage von dem heterologen und dem homologen Serum außerhalb der Diskussion lasse.



Kurve 1.

Ziege No. 78, Gewicht 26 kg, erhielt mit Zwischenräumen von einer Woche 3 aufeinander folgende Injektionen von 50 ccm Coliagglutinin. Blutproben wurden alsdann 15<sup>m</sup>, 2<sup>h</sup>, 5<sup>h</sup>, 10<sup>h</sup>, 24<sup>h</sup> und 34<sup>h</sup> nach den Injektionen und dann eine Woche hindurch jeden Tag auf denselben Glockenschlag entnommen. Die auf Eis aufbewahrten Proben wurden



alle an einem und demselben Tage und mit denselben Kulturen mit der vorstehend angegebenen Methodik untersucht.

An Ziege No. 79, Gewicht 26 kg, wurde ein ganz analoger Versuch mit 50 ccm Typhusagglutinin vorgenommen.

Ziege No. 1 erhielt in ganz entsprechender Weise 50 ccm Vibrioantilysin. Dieses Tier, das 10 Tage vorher Zicklein bekommen hatte, gab Milch, weshalb Milchproben gleichzeitig mit den Blutproben entnommen wurden.

Das Resultat der Bestimmungen hinsichtlich dieser drei Tiere findet sich in Kurve No. 1, No. 2 und No. 3. Auf den Kurven ist in gewohnter Weise die Zeit längs der Abszissenachse angegeben und die Antikörpermenge, in willkürlichen Einheiten ausgedrückt, als die entsprechenden Ordinaten abgesetzt.

Bei dem Versuch mit Ziege No. 78 sieht man, wie die Kurve nach jeder neuen Injektion eine Steigung zeigt, welche rasch verschwindet. Nach der 1. und 3. Injektion kommen einige Schwankungen vor, welche sogar über den ersten Klimax hinausreichen. Ob dies innerhalb der Unregelmäßigkeiten und Schwankungen in der Methodik liegt, oder ob es wirklich Erscheinungen sind, welche bei der passiven Immunisierung entstehen, ist nach so wenigen Versuchen schwierig zu entscheiden; aber diese Frage wird in nächster Zukunft wieder aufgenommen und durch besondere Versuche erörtert werden, da sie, sofern sich später herausstellt, daß jene konstant sind, für die Erklärung des Verschwindens der Antikörper bei passiver Immunisierung von großer Bedeutung ist.

Man kann wohl rechnen, daß die Ziege, welche 26 kg wog,  $\frac{1}{20}$  ihres Körpergewichtes, also ca. 1300 ccm Blut mit ca. 870 ccm Serum hatte.

Vor der Injektion des Coliagglutinins in das Blut, enthielt dieses ca. 20000 willkürliche Agglutinineinheiten; mit den 50 ccm Serum wurden 170000 Agglutinineinheiten eingeführt; oder insgesamt ca. 190000, was pro Kubikcentimeter Serum ca. 218 Agglutinineinheiten gibt.

Die Agglutininkonzentration sollte daher nach dieser Berechnung steigen:

nach der 1. Injekt. auf 218 Einh., erreichte aber nur 90: 41 Proz.

" " 2. " " 252 " " " " 120: 48 "  
 " " 3. " " 258 " " " " 200: 78 "

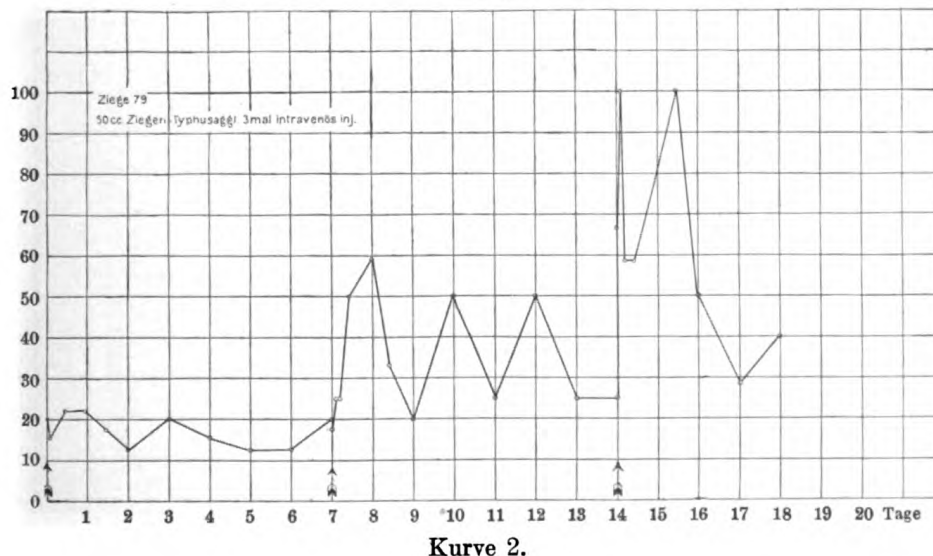
Eine Vorstellung von dem Fallen, ausgedrückt in Agglutinineinheiten pro Kubikcentimeter, erhält man, wenn man sieht, wie dieses

in der 1. Woche von 90 auf 34: auf 38 Proz. sinkt

" " 2. " " 120 " 40: " 33 " "  
 " " 3. " " 200 " 70: " 35 " "

Ich habe immer mit den höchsten und niedrigsten Werten der Kurven gerechnet.

Die Versuche mit Ziege No. 79, Kurve No. 2, zeigen Verhältnisse, welche den vorhergehenden sehr ähnlich sind.



Kurve 2.

Im Serum dieses Tieres fand sich normal keine nennenswerte Menge Typhusagglutinin, und bei einer ähnlichen Betrachtung wie vorstehend findet man, daß die Agglutininmenge steigen müßte:

bei der 1. Injektion auf 144, sie erreichte nur 22: 15 Proz.

" " 2. " " 156, " " " 60: 38 "  
 " " 3. " " 169, " " " 100: 59 "

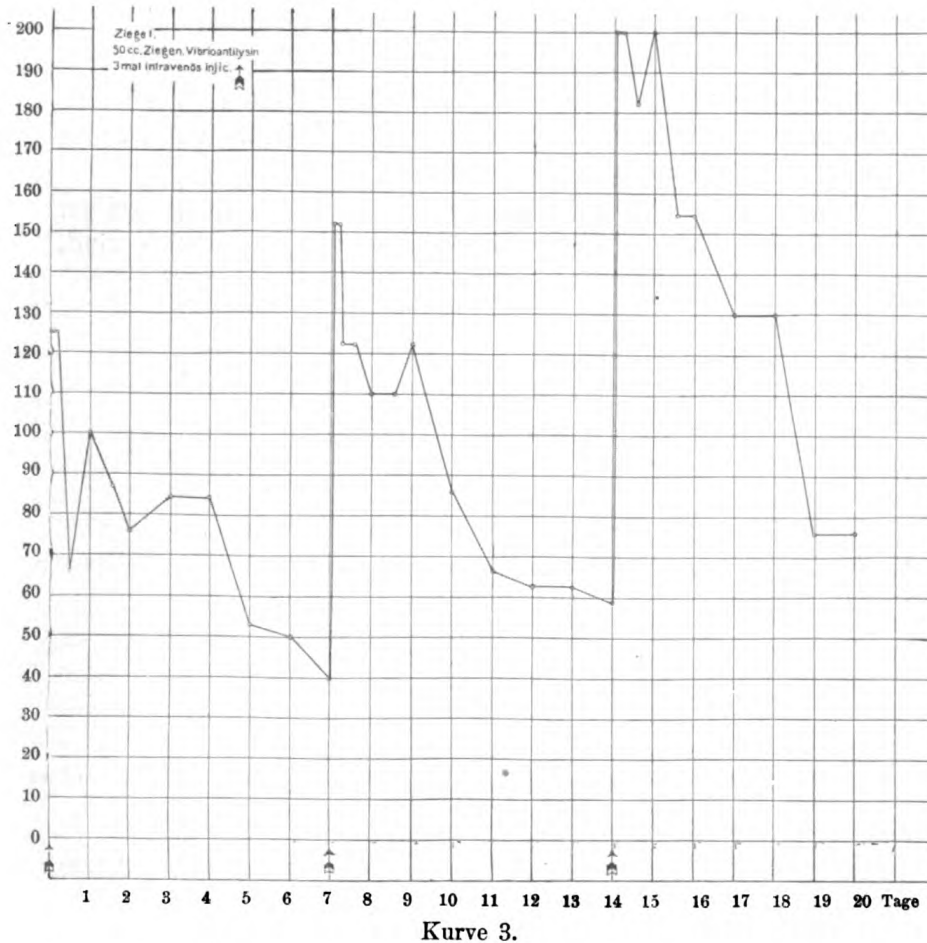
Mit Rücksicht auf das Fallen sinkt die Agglutininmenge

in der 1. Woche von 22 auf 12: auf 55 Proz.

" " 2. " " 60 " 20: " 33 "

" " 3. " " 100 " 30: " 30 "

Das in Kurve No. 3 wiedergegebene Resultat der Versuche mit Ziege No. 1 erweist sich bedeutend regelmäßiger als bei den vorhergehenden Versuchen; betreffs der Unregel-



mäßigkeiten, welche die Kurve zeigt, gilt dasselbe, was zuvor hinsichtlich der Technik bei Agglutininmessung bemerkt worden ist.

Das Serum des Tieres enthielt normal kein meßbares Antilysin. Die injizierten 50 ccm Antilysin enthielten 250 000 Einheiten. Geht man davon aus, daß die Ziege, welche



35,5 kg wog, ca. 1775 ccm Blut oder ca. 1180 ccm Serum hat, so müßte die Antilysinmenge

nach der 1. Injekt. auf 212 steigen, sie erreichte nur 125: 59 Proz.

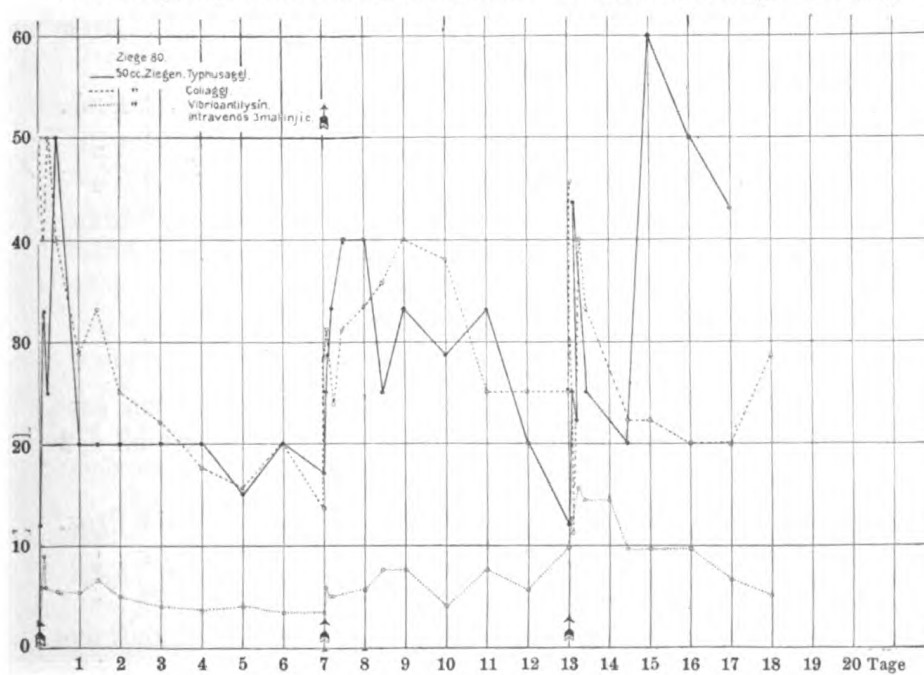
"	"	2.	"	"	252	"	"	"	"	151: 60	"
"	"	3.	"	"	270	"	"	"	"	200: 74	"

Was das Fallen anbelangt, so sinkt die Antilysinmenge

in der 1. Woche von 125 auf 40: 32 Proz.

"	"	2.	"	"	151	"	60: 40	"
"	"	3.	"	"	200	"	75: 38	"

Während es sich bei diesen Versuchen um einen einzelnen Antikörper gehandelt hat, wurden die Versuche an Ziege No. 80,



Kurve 4.

Kurve No. 4, vorgenommen, um zu ermitteln, wie ein Organismus sich verhalten würde, wenn er auf einmal eine Injektion von drei verschiedenen Antikörpern zusammengemischt erhielt — 50 ccm Typhusagglutinin, 50 ccm Coliagglutinin und 50 ccm Vibrioantilysin — alle von Ziegen herstammend. Diese 150 ccm, zusammengemischt, wurden in gewöhnlicher Weise 3mal mit Zwischenräumen von einer Woche in die Vena

jugularis injiziert, Kurve No. 4 zeigt das Resultat. Trotzdem man auch hier die früher besprochenen Schwankungen sieht, erhält man doch den bestimmten Eindruck, daß die Schnelligkeit, mit der die Ausscheidung vor sich geht, selbst unter diesen komplizierten Verhältnissen keine wesentlichen Veränderungen erfährt.

Untersuchen wir die quantitativen Verhältnisse, so finden wir folgendes: das Serum dieser Ziege enthielt normal keine nennenswerte Menge Typhus- oder Coliagglutinin oder Vibrioantilysin; sie wog 34 kg, was nach Annahme ca. 1700 ccm Blut mit ca. 1100 ccm Serum entsprach. Die injizierten 50 ccm Coliagglutinin enthielten 170 000 Einheiten.

Man könnte daher erwarten, daß das Coliagglutinin steigen würde

nach der 1. Injektion auf 154, es erreichte nur 50: 32 Proz.

"	"	2.	"	"	166,	"	"	"	40: 24	"
"	"	3.	"	"	179,	"	"	"	45: 25	"

Was das Fallen anbelangt, so sinkt die Agglutininmenge

in der 1. Woche von 50 auf 12: auf 24 Proz.

"	"	2.	"	"	40	"	25:	"	63	"
"	"	3.	"	"	45	"	20:	"	44	"

Das Typhusagglutinin: Die injizierten 50 ccm enthielten 125 000 Einheiten, man könnte daher erwarten, daß die Agglutininmenge steigen würde

nach der 1. Injektion auf 113, sie erreichte nur 50: 44 Proz.

"	"	2.	"	"	128,	"	"	"	40: 31	"
"	"	3.	"	"	124,	"	"	"	60: 48	"

Was das Fallen anbelangt, so sinkt die Agglutininmenge

in der 1. Woche von 50 auf 15: auf 30 Proz.

"	"	2.	"	"	40	"	11:	"	27	"
"	"	4.	"	"	60	"	42:	"	70	"

Vibrioantilysin: Die 50 ccm enthielten 250 000 Einheiten. Die Antilysinmenge mußte daher steigen

nach der 1. Injektion auf 227, sie erreichte nur 8: 3,5 Proz.

"	"	2.	"	"	231,	"	"	"	8: 3,5	"
"	"	3.	"	"	231,	"	"	"	15: 7	"

Was das Fallen anbelangt, so sinkt die Agglutininmenge

	in der 1. Woche von	8	auf 4:	auf 50 Proz.
"	" 2.	"	" 8	" 4: " 50 "
"	" 3.	"	" 15	" 5: " 33 "

Die 4 angeführten Versuche sind genau komparabel, indem es sich um 4 Ziegen von ungefähr gleichem Gewicht handelt, und von den injizierten Antikörpern — Typhusagglutinin, Coliagglutinin und Vibrioantilysin — ist ganz dieselbe Menge an demselben Tage und zur selben Zeit injiziert, und die Bestimmung der Kurven für alle 4 Tiere ist am selben Tage mit demselben Blut und derselben Typhus- und Colikultur vorgenommen worden.

Hält man diese 4 Versuche gegeneinander, so fällt in die Augen, daß die Antikörperkonzentration, die man nach der Berechnung erwarten konnte, niemals erreicht wird. Im Gegenteil ist das Manko sehr bedeutend, die beobachtete Antikörperkonzentration ist nur 40—60 Proz. der berechneten. Selbst wenn man recht großen Irrungen in wesentlichen Punkten ausgesetzt ist, z. B. mit Rücksicht auf die Berechnung der totalen Blutmenge, scheint doch kein Zweifel darüber obzuwalten, daß bedeutende Mengen Antikörper gleich nach der Einführung in den Kreislauf verschwinden. Ob sie irgendwo im Organismus gebunden oder ausgeschieden werden, läßt sich zurzeit nicht entscheiden.

Fast man die 3 ersten Versuche ins Auge, so ist es auffällig, daß bei der 3. Injektion prozentisch weit weniger verschwindet als bei den beiden vorhergehenden.

Bei dem vierten Versuch an Ziege No. 80, wo die Verhältnisse äußerst kompliziert sind, zeigt sich durchweg, daß die erzielte Antikörpermenge prozentisch kleiner ist als bei den vorhergehenden Versuchen. Besonders schlagend wird dies beim Vibrioantilysin, das nur 3—7 Proz. des berechneten erreichte. Weitere Versuche sind vonnöten, um eine befriedigende Erklärung dieser Erscheinung zu erhalten.

Wie sich das Fallen bei 3 aufeinander folgenden Injektionen mit Zwischenräumen von einer Woche gestaltet, darüber gewähren die Versuche recht übereinstimmende Resultate. Es beträgt in der Regel 30—50 Proz., und wenn

man die Unregelmäßigkeiten in Betracht zieht, erhellt, daß das Fallen sich mit den Injektionen nicht wesentlich verändert.

In diesem Punkte sind meine Versuche in voller Uebereinstimmung mit denjenigen Famuleners.

Die Ziege No. 80 hatte 7 Tage, bevor die Versuche begannen, ein Zicklein bekommen, das sie während des Versuches säugte. Bevor dies anfang, wurden Milchproben von der Ziege und Blutproben von dem Zicklein genommen, und hiermit wurde während des Versuches fortgefahren. Milchproben von Ziege No. 80 wie gleichfalls von der mit Vibrio-antilysin behandelten Ziege No. 1 enthielten, wie sich bei der Untersuchung herausstellte, keine meßbare Mengen Antilysin. In guter Uebereinstimmung hiermit steht die Beobachtung, daß die Untersuchung des Blutes des Zickleins auf Vibrio-antilysin, Coliagglutinin und Typhusagglutinin beständig ein negatives Resultat ergab, trotzdem die Mutter bedeutende Mengen dieser Antikörper erhalten hatte.

Dies ist ein neues Anzeichen von dem großen Unterschied, der zwischen einem aktiv und einem passiv immunisierten Organismus obwaltet. Bekanntlich ist man zahlreiche Male imstande gewesen, den Uebergang des Antitoxins in die Milch bei aktiv immunisierten Tieren nachzuweisen, wie dies zum erstenmal durch Ehrlichs klassische Ammenversuche so hübsch klargemacht worden ist.

#### **Versuche mit verschiedenen Applikationsweisen von Antikörpern.**

Während man früher stets die subkutane Applikationsweise als normale Methode benutzte, erheben sich neuerdings mehr und mehr Stimmen dafür, daß es in vielen Fällen von großem Vorteil sein wird, Antikörper intravenös anzuwenden, welches Verfahren verschiedene Kliniker bereits längere Zeit hindurch angewendet haben, z. B. bei schweren Fällen von Diphtherie.

Intravenöse Injektion ist empfohlen von Behring, von C. J. Martin, von Cruveilhier u. a., und ich persönlich habe selbst Gelegenheit gehabt, den Nutzen dieser Behandlungsweise zu sehen bei der Pestepidemie in Porto 1899, wo die Serumtherapie von Calmette, Salimbeni und

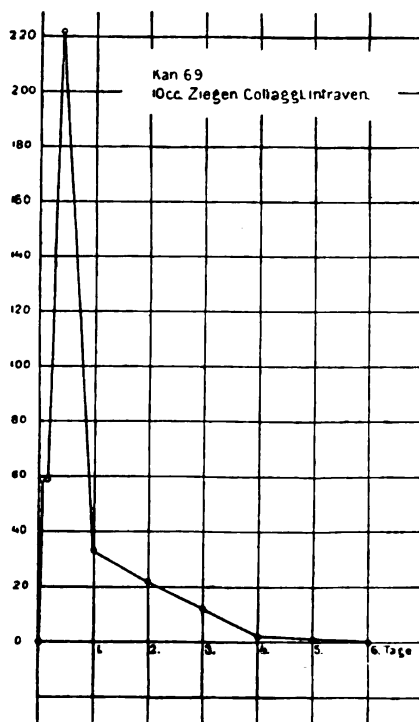
Levin probiert wurde. Hier zeigte sich, daß man nur ziemlich schwache Ausschläge sah, solange das Serum subkutan angewendet wurde, daß aber der therapeutische Effekt wesentlich besser wurde, als man dazu übergang, es intravenös einzuspritzen.

Ueber das Diphtherieantitoxin liegen Versuche vor hier aus dem Institut von Henderson Smith<sup>1)</sup>, und Madsen ist für die großen Vorzüge dieser Applikationsmethode in Infektionskrankheiten mit schweren Vergiftungen eingetreten<sup>2)</sup>.

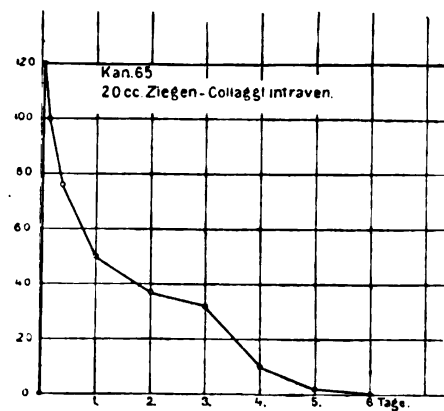
#### Intravenöse Injektion an Kaninchen von verschiedenen Mengen Coliagglutinin.

Das benutzte Coliagglutinin stammt von einer Ziege, war also heterolog. Die Versuche umfaßten 6 Kaninchen von einem

Gewicht von ungefähr 2200 g. Von diesen erhielten zwei 10, zwei 20 und zwei 40 ccm Coliagglutinin in die Ohrenvene eingespritzt. Die Resultate finden sich in den Kurven 5—9 aufgeführt. Das eine der Kaninchen, welche 10 ccm erhalten



Kurve 5.

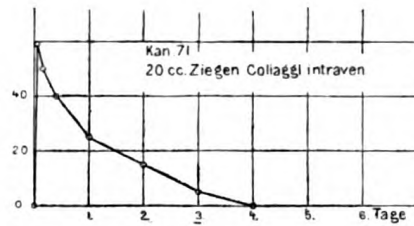


Kurve 6.

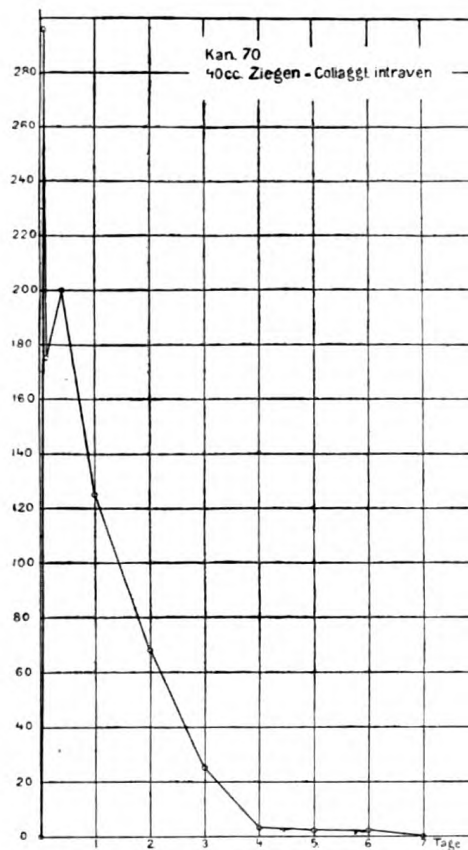
1) J. Henderson, Smith, On the absorption of antibodies from the subcutaneous tissues and peritoneal cavity. The Journal of Hygiene 1907, Vol. 7, p. 205.

2) Th. Madsen, Discuss. 12. allm. svenska läkaremötet i Malmö 1905. Hygiea, 1905.

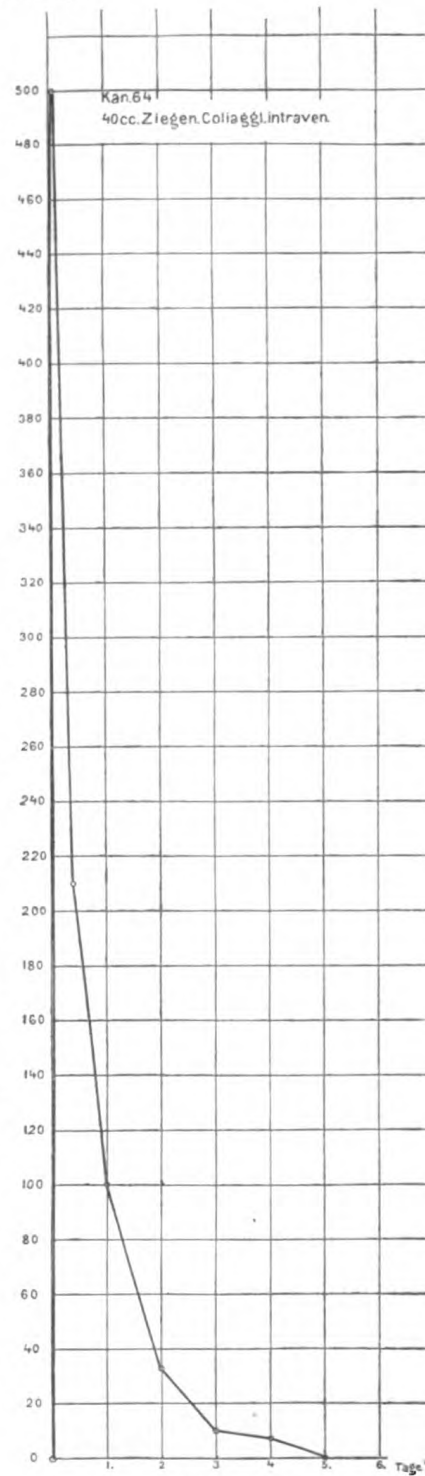




Kurve 7.



Kurve 8.



Kurve 9.

hatte, starb durch einen Unfall, bei dem anderen muß wahrscheinlich bei der Injektion ein Malheur passiert sein, indem das Maximum nicht gleich nach derselben, sondern erst ca. 12 Stunden später erreicht wurde; bei den übrigen wurde der ganz regelmäßige gleichmäßige Niedergang gefunden von demselben Typus, der zuerst von Jörgensen und Madsen<sup>1)</sup> beschrieben worden ist.

Vergleicht man diese 5 Kurven, so tritt die Eigentümlichkeit hervor, daß das Tier, welches 10 ccm erhalten hatte, eine bedeutend höhere Agglutininmenge, pro ccm Blut 220 Einheiten, erreichte als die beiden, welche 20 ccm erhielten, wo das eine nur 60, das andere 120 erreichte, während die beiden Tiere, welche 40 ccm erhielten, 288 bzw. 500 erreichten; also auch hier machten sich bedeutende individuelle Unterschiede zwischen den Tieren geltend.

Da die Kaninchen ca. 2200 g wogen, muß angenommen werden, daß die Blutmenge ca. 110 ccm war mit ca 75 ccm Serum. Vor der Injektion enthielt keines der Sera der Tiere nennenswerte Mengen Agglutinin. Das benutzte Coli-agglutinin enthielt 33333 Agglutinineinheiten in 10 ccm. Hier-nach könnte man folgende Tabelle aufstellen:

Kaninchen 69 erhielt 10 ccm, sollte 444 Einh. pro ccm erreichen,									
erreichte									
aber nur 220 = 50 %									
„	71	„	20	„	„	888	„	„	60 = 7 „
„	65	„	20	„	„	888	„	„	120 = 14 „
„	70	„	40	„	„	1776	„	„	290 = 16 „
„	64	„	40	„	„	1776	„	„	500 = 28 „

Die beobachtete Menge war also in allen Fällen ganz bedeutend geringer, als berechnet.

Hält man diese Zahlen mit den früher erwähnten (Ziegenantikörper, injiziert an einer Ziege) zusammen, so erhält man den Eindruck, daß hier bei dem heterologen Serum bedeutend mehr Antikörper prozentisch verschwinden als beim homologen (40–60 Proz.).

Sofern man untersucht, wie lange es dauert, bis dieses heterologe Agglutinin aus der Blutbahn verschwindet, so ist

1) Festschrift ved Indvielsen af Statens Seruminstitut, 1902.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. I.

die Zeit in allen Fällen ungefähr dieselbe, ca. 4–6 Tage, und man sieht, daß es keinen großen Unterschied gemacht hat, ob der Fall mit 60 Einh. (Kurve 7) oder mit 500 Einh. (Kurve 9) anfing.

#### Vergleich der subkutanen mit der intramuskulären Injektion.

Wieviel geringer das Resultat bei der subkutanen Injektion wird als bei der intravenösen, geht deutlich hervor aus Henderson Smiths vorstehend zitierter Arbeit, wie gleichfalls aus den späteren Abhandlungen Famuleners<sup>1)</sup> und Tallquists<sup>2)</sup>. Da man bisweilen bei Injektionen auch die intramuskuläre Applikation anwendet, welche übrigens neuerdings von Morgenroth empfohlen worden ist, habe ich es für von Interesse gehalten, dieses Verfahren in meine Versuche hereinzuziehen.

Vier Kaninchen von gleichem Gewicht, 2200 g, wie die vorhergehenden erhielten 20 ccm Ziegencoliagglutinin injiziert. Zwei, No. 66 und 68, subkutan, die beiden anderen, No. 63 und 67, intramuskulär in die Glutealmuskulatur. Das Resultat findet sich in den Kurven 10–13.

Wenn man diese mit den Versuchen in den Kurven 6 und 7 vergleicht, mit welchen sie ganz komparabel sind, so gewähren sie einen neuen Beweis dafür, wieviel mehr durch intravenöse Injektion erreicht wird als durch die anderen Methoden, aber gleichzeitig zeigt dieser Versuch deutlich, daß die intramuskuläre Applikationsweise der subkutanen wesentlich überlegen ist. Das Maximum wurde in allen Fällen ungefähr am 3. Tage nach der Injektion mit ca. 6 und 40 Einheiten bei den zwei subkutan injizierten gegen ca. 56 Einheiten bei den beiden intramuskulär injizierten erreicht; auch die Menge, welche in den ersten 24 Stunden — häufig der kritische Tag bei der Serumbehandlung — in

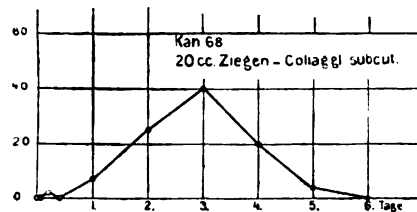
---

1) Famulener, A report of immunisation curves derived from goats treated with certain haemolytic bacterial toxins. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 44, 1907, p. 58.

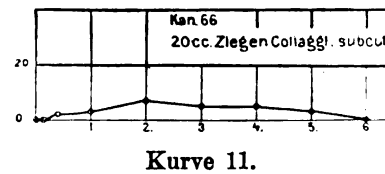
2) Tallquist, Untersuchungen über aktive und passive Immunisierung mit Vibriolysin. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. 58, 1908, p. 165.

den Kreislauf hinein gelangte, ist ganz wesentlich größer als bei den subkutan injizierten.

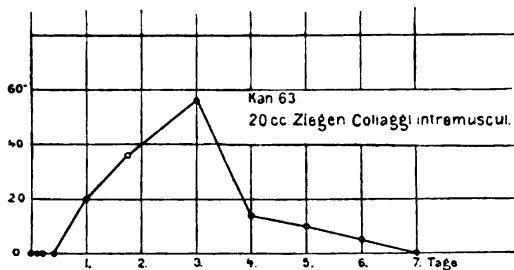
Man wird übrigens auch hier gewahr, wie groß die individuellen Verschiedenheiten bei den Versuchstieren sind; dahingegen scheint die Ausscheidung, nachdem das Maximum erreicht ist, in allen Fällen mit ungefähr gleicher Schnelligkeit zu verlaufen. Ungefähr am 6. Tage ist kein Agglutinin mehr im Blute nachzuweisen. Es hat den Anschein, als ob der Zeitpunkt, wo alles verschwunden ist, bei diesen 4 Tieren etwas später eintritt als bei den 2 Kontroll-



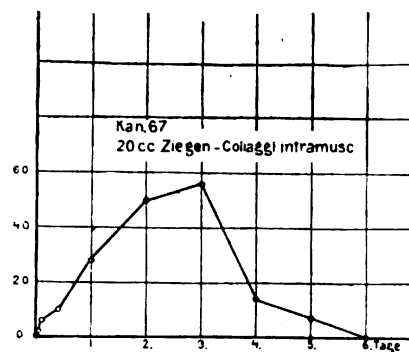
Kurve 10.



Kurve 11.



Kurve 13.



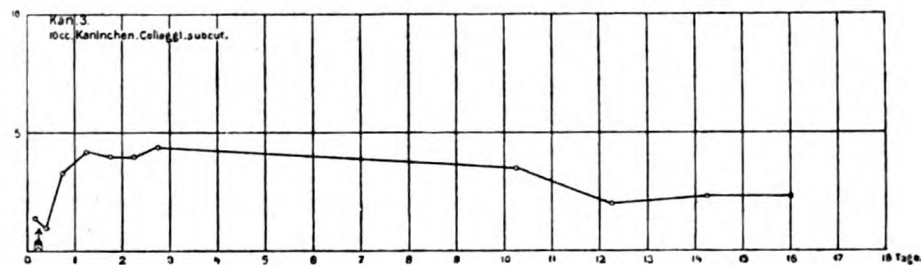
Kurve 12.

tieren (Kurve 6 und 7), welche die Injektion intravenös erhalten haben.

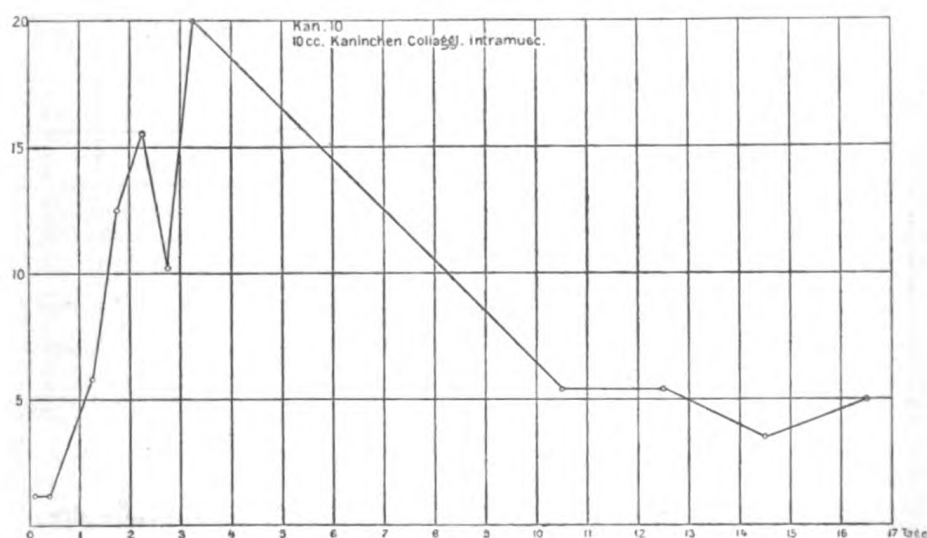
Vergleichen wir wie bei den vorhergehenden Versuchen die Mengen, die nach Berechnung im Kreislauf zu finden sein müßten, mit den tatsächlich erreichten, so erhalten wir folgende Resultate:

In Kaninchen		berechnete Menge	beobachtete Menge
68	20 ccm subkutan	888	40 = 4,5 Proz.
66	20 " "	888	8 = 0,9 "
63	20 " intramusk.	888	58 = 6,5 "
67	20 " "	888	58 = 6,5 "
2*			

Die folgenden Versuche sind mit einem homologen Serum, Kaninchencoliagglutinin, gemacht worden, von welchem 10 ccm an Kaninchen No. 3 subkutan, an Kaninchen No. 10 intramuskulär (Glutealmuskel) injiziert wurden. Die Resultate sind in Kurve No. 14 und 15 aufgestellt. Sie sind analog mit



Kurve 14.



Kurve 15.

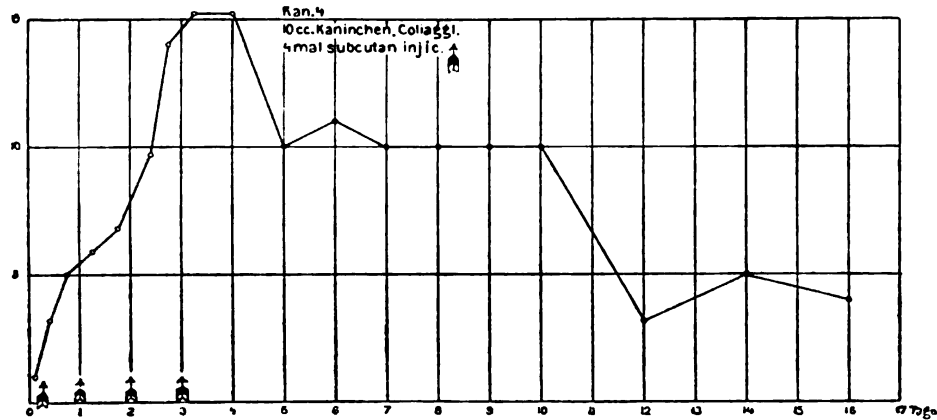
denen der vorhergehenden Versuche und zeigen die Ueberlegenheit der intramuskulären Injektion, indem das Maximum, das ungefähr am 3. Tage erreicht wurde, bei dem intramuskulär injizierten Kaninchen 20 Einheiten beträgt, während es bei dem subkutan injizierten nur ca. 4,5 Einheiten ist.

Der Schluß der Kurve zeigt deutlich, wie sich in diesem Falle der Unterschied zwischen dem homologen und dem heterologen Serum stark geltend macht, indem hier noch am

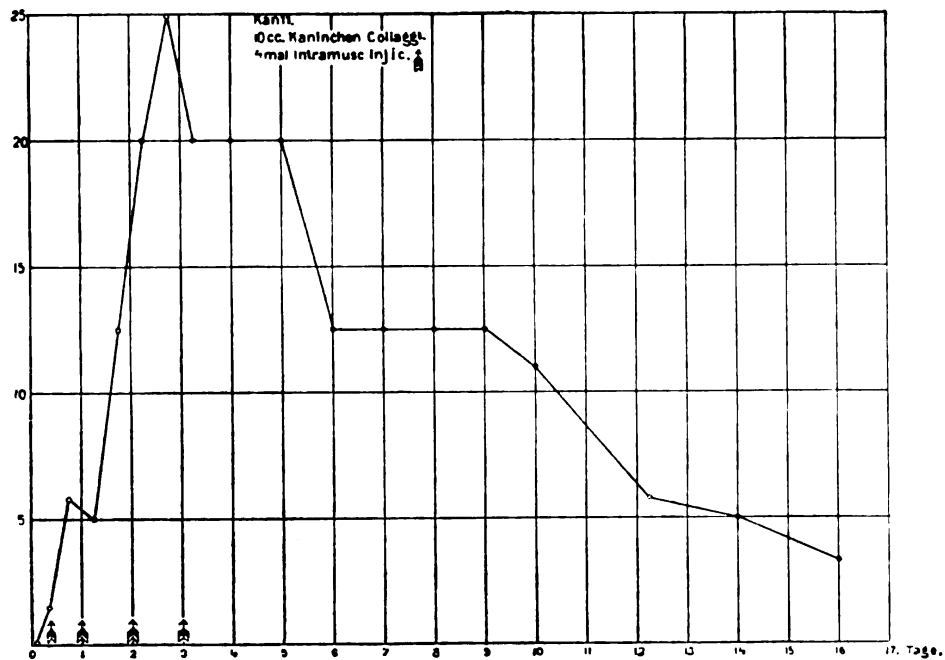


16. Tage deutliche Mengen von Agglutinin konstatiert werden konnten.

Um den Verhältnissen näher zu kommen, wie wir sie bei der klinischen Serumbehandlung antreffen, sind ein paar Ver-



Kurve 16.



Kurve 17.

suche gemacht worden, wo 4 Tage hintereinander die gleiche Menge, 10 ccm, Kaninchencoliagglutinin

injiziert worden ist; bei Kaninchen No. 4 subkutan und bei Kaninchen No. 11 intramuskulär. Das Resultat ist ungefähr dasselbe wie bei den vorhergehenden Versuchen. Die intramuskuläre Injektion betätigte ihre Ueberlegenheit dadurch, daß das Maximum, das bei beiden Versuchen ungefähr am 3. Tage eintrat, bei dem intramuskulär behandelten 25 Einheiten erreichte gegen ca. 15 bei dem subkutan injizierten. Auch hier war die Ausscheidung langsam und noch am 16. Tage konnte deutliches Agglutinin nachgewiesen werden. Untersuchen wir dies in gleicher Weise wie zuvor das Verhältnis zwischen der Menge, die nach Berechnung im Kreislauf zu finden sein sollte, und der wirklich beobachteten, so stellt sich das Verhältnis, wie folgt:

Kaninchen				be- rechnet	be- obachtet
3	subkutan	10 ccm	} Ziegen- coli- aggl.	77	4 = 5 Proz.
10	intramusk.	10 "		77	20 = 26 "
4	subkutan	40 "		308	15 = 5 "
11	intramusk.	40 "		308	25 = 8 "

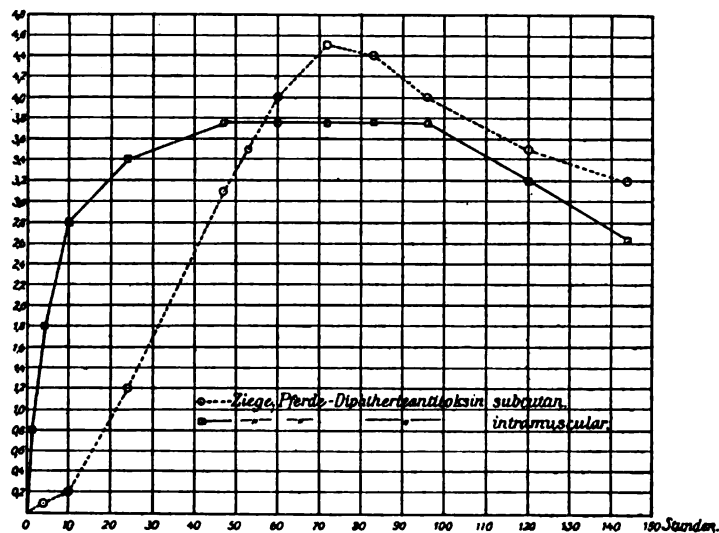
Auf Grund der Bedeutung, welche die Untersuchungen der Resorptionsverhältnisse für die Klinik haben, habe ich es für zweckmäßig gehalten, sie dahin auszudehnen, daß sie einen praktisch anwendbaren Antikörper enthalten, und habe daher einen Vergleich zwischen einer intravenösen und einer subkutanen Injektion von Diphtherieantitoxin an zwei Ziegen vorgenommen. Das Antitoxin stammte von einem Pferd und enthielt, wie sich herausgestellt hatte, 600 Einheiten pro Kubikcentimeter. Da es sich hier darum handelte, ziemlich kleine Antitoxinmengen zu messen, wurde nicht die gewöhnliche Testdosis des Instituts,  $L_t = 0,23$  ccm, sondern nur  $\frac{1}{10}$  Teil davon, 0,023 ccm angewendet, worin ca. 5 tötende Dosen enthalten waren, indem die Dosis min. let. für Meerschweinchen von 250 g 0,005 ccm beträgt.

Die Ziegen hatten genau dasselbe Gewicht 36,5 kg, und ihnen wurden 20 ccm Diphtherieantitoxin, 12000 IE, gegeben, bei Ziege No. 110 subkutan, bei Ziege No. 111 intramuskulär in die Schenkelmuskulatur hinein.

Die Messungen sind unten angeführt:

No. 110		No. 111	
Subkutane Injektion		Intramuskuläre Injektion	
Stunde	IE pro ccm	Stunde	IE pro ccm
0	< 0,025	0	0,025
1	< 0,03	1	0,8
4	ca. 0,05	4	1,8
10	0,2	10	2,8
24	1,2	24	3,4
47	3,1	47	3,75
53	3,5	60	3,75
60	4,0	72	3,75
72	4,5	83	3,75
83	4,4	96	3,70
96	4,0	120	3,2
120	3,5	144	2,66
144	3,2		

Kurve 18/19 gibt das Resultat graphisch an. Auch hier gehen die Vorzüge der intramuskulären Injektion schlagend



Kurve 18/19.

hervor, indem die Resorption viel schneller zustande kommt. Besonders groß ist der Unterschied während der ersten Tage, indem die im Blute erreichte Antitoxinkonzentration nach 10 Stunden 14mal größer bei der intramuskulären als bei der subkutanen Applikation ist; nach 24 Stunden ist das Verhältnis noch ca. 3:1.

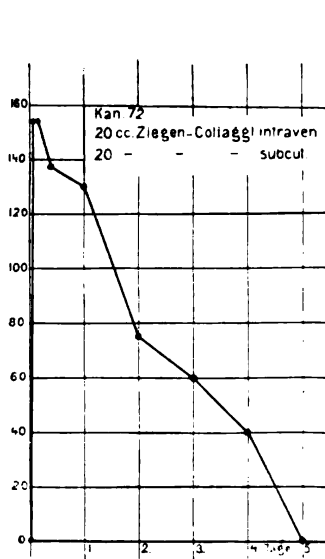
Im Gegensatz zu den früher angeführten Versuchen war das Maximum aber etwas höher bei der subkutanen als bei der intramuskulären Einführung, es wurden resp. 4,5 und 3,75 IE pro ccm erreicht.

Wird die gesamte Serummengde auf ca. 1200 ccm geschätzt, so konnte man erwarten, daß pro 1 ccm Serum ca. 10 IE erreicht werden sollten. Die beobachteten Werte entsprechen also 45 Proz. resp. 38 Proz.

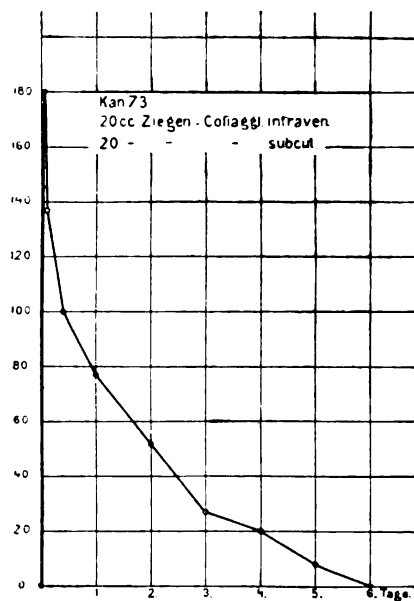
Nach dem Maximum nehmen die Antitoxinwerte sehr langsam ab, noch 3 Wochen nach der Injektion konnten Spuren nachgewiesen werden.

#### Kombination von intravenöser und subkutaner bzw. intramuskulärer Injektion.

! Wenn es sich darum handelt, in der Praxis eine rasch eintretende, lang andauernde Antitoxinwirkung zu erzielen,



Kurve 20.

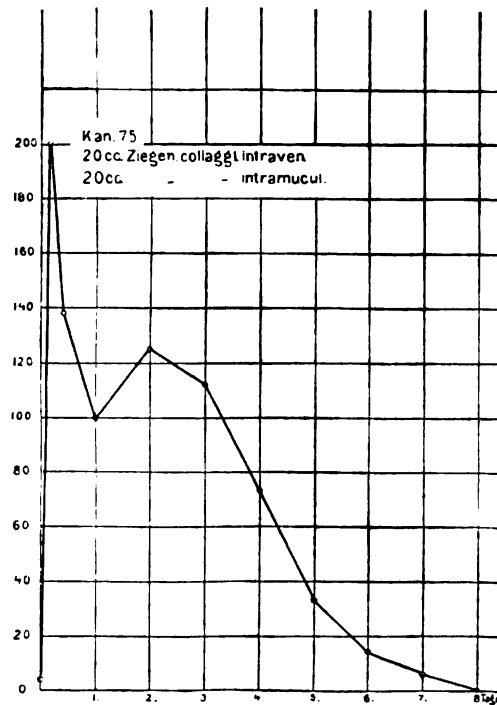


Kurve 21.

scheint es rationell, eine Kombination von intravenöser Injektion mit einer der anderen Methoden anzuwenden.

An den Kaninchen 72 und 73 ist gleichzeitig 20 ccm Ziegencoliagglutinin intravenös und 20 ccm Ziegencoliagglutinin

subkutan injiziert worden; wie zu erwarten war, wurde gleich eine verhältnismäßig hohe Agglutininkonzentration des Blutes erzielt, aber die folgenden Tage fiel die Menge schnell (siehe die Kurven 20—21) und am 5. resp. 6. Tage nach der Resorption war nichts mehr davon nachzuweisen. Etwas besser scheinen sich die Verhältnisse zu gestalten bei einer Kombination von intravenöser und intramuskulärer Injektion (siehe die Versuche in Kurve 22 mit Kaninchen 75, welches gleichzeitig 20 ccm Ziegencoliagglutinin intravenös und 20 ccm Ziegencoliagglutinin intramuskulär erhielt). Hier sinkt die Kurve am 1. Tage regelmäßig, steigt aber



Kurve 22.

am 2. Tage wieder etwas, was vielleicht als eine, von der intramuskulären Injektion herstammende Resorption aufgefaßt werden kann; danach sinkt die Kurve stetig, erst am 8. Tage ist jede Spur verschwunden. Dieses Resultat ist also etwas besser als die beiden vorhergehenden Versuche, doch darf man wohl nicht allzu viel Gewicht auf dieses einzelne Beispiel legen, wenn man die großen individuellen Unterschiede bei den Versuchstieren berücksichtigt, welche aus dem Vorhergehenden deutlich ersichtlich sind.

### Zusammenfassung.

Das Resultat der vorstehenden Untersuchungen läßt sich kurz zusammenfassen, wie folgt:

1) Werden mit Zwischenräumen von einer Woche 3 aufeinander folgende intravenöse Injektionen derselben Menge Anti-

körper (Coliagglutinin, Typhusagglutinin, Vibrioantilysin) vorgenommen, so ist die Schnelligkeit, mit der diese Antikörper aus dem Kreislauf verschwinden, nach allen 3 Injektionen dieselbe.

2) Ein gleiches gilt, sofern es sich nicht nur um einen einzelnen Antikörper allein handelt, sondern um eine Mischung aller der drei vorgenannten.

3) Die Antikörperkonzentration, pro Kubikcentimeter Blut, welche durch direkte Einführung von Antikörpern in die Blutbahn erzielt wird, ist ganz wesentlich geringer, als man, sofern der einverleibte Antikörper ganz einfach in der Blutmasse verdünnt würde, erwarten sollte. In der Regel werden durch einen homologen Antikörper nur 40—60 Proz. hiervon erreicht, bei Einführung mehrerer verschiedener Antikörper gleichzeitig wird die Konzentration derselben bisweilen weit geringer (0,3—6 Proz.).

4) Es hat den Anschein, als ob unmittelbar nach der Injektion von heterologem Serum in die Blutbahn prozentlich mehr verschwindet als von homologem.

5) Selbst bei anscheinend ganz gleichartigen Tieren von gleichem Gewicht kann man nach Einführung derselben Menge Antikörper die Konzentration desselben im Blute sehr verschieden finden. In dieser Hinsicht ist ein Unterschied von über 50 Proz. beobachtet worden. Die individuellen Unterschiede sind also sehr groß.

6) Selbst wenn so verschiedene Mengen heterologen Antikörpers (Ziegen-Coliagglutinin), wie 10 ccm, 20 ccm oder 40 ccm, an Kaninchen eingeführt werden, kann doch nach Verlauf von ca. 6 Tagen darum nichts mehr im Kreislauf nachgewiesen werden, einerlei ob es intravenös, intramuskulär oder subkutan einverleibt wurde. Man hat also keine Aussicht, die Dauer der passiven Immunität, z. B. bei einer Schutzimpfung mit Antitoxin, durch eine Vermehrung der Menge des einzuspritzenden Antitoxins zu verlängern.

7) Im Gegensatz hierzu hält sich homologes Serum (Kaninchen-Coliagglutinin bei Kaninchen, Pferde-Diphtherieantitoxin bei Ziege) weit länger im Kreislauf, in meinen Versuchen ca. 3 Wochen.



8) Bei der subkutanen und intramuskulären Applikation wird der Antikörper viel langsamer resorbiert als bei der intravenösen, das Maximum wird erst ungefähr am 3. Tage erreicht und ist bedeutend geringer, als was erreicht sein würde, sofern der Antikörper direkt in den Kreislauf eingeführt worden wäre.

9) In den ersten 24 Stunden nach der Injektion wird bei der intramuskulären Applikation bedeutend mehr resorbiert als bei der subkutanen, was ersterer eine besondere klinische Bedeutung verleiht.

10) Ein augenfälliger Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen homologem und heterologem Antikörper war in meinen Versuchen nicht nachzuweisen, dagegen hielt sich dieses erstere mehr als dreimal so lange in der Blutbahn.

Für die Klinik kann folgendes konstatiert werden:

11) Ist es von Wichtigkeit, daß ein Antikörper einem Pat. rasch zugute kommt, so möge derselbe intravenös einverleibt werden; man kann das Verbleiben des Antikörpers im Kreislauf dadurch verlängern, daß man gleichzeitig eine intramuskuläre Injektion verabreicht.

12) Erschweren praktische Umstände es dem Antikörper, in die Venen zu gehen, so muß derselbe intramuskulär einverleibt werden; hierdurch wird eine raschere Resorption erzielt als bei der subkutanen Applikation.

13) Gilt es, die Antikörperkonzentration längere Zeit hindurch auf einer bestimmten Höhe zu erhalten, so kann dies (siehe 6) nicht durch Eingabe einer größeren Menge Antitoxin in einer einzelnen Injektion erreicht werden, sondern es ist vorzuziehen, während des betreffenden Zeitraumes eine Reihe relativ kleinerer Dosen zu verabreichen.

[Aus dem Institut Pasteur, Bruxelles; Direktor:  
Prof. Dr. Jul. Bordet.]

### **Existieren echte Antialexine (Antikomplemente)?**

Von Dr. med. **Osv. Streng**, Dozent, Helsingfors (Finland).

Wie bekannt, haben Bordet, Ehrlich und Morgenroth die Theorie von Antialexinen (Antikomplementen) aufgestellt und näher begründet. Sie haben gezeigt, daß, wenn man einem Tiere der Species A Serum von einem Tiere der Species B injiziert, sich das Serum vom Tiere der Species A in der Richtung verändert, daß es, in genügender Menge zum Serum von Tierspecies B zugefügt, das Alexin (Komplement) dieses Serums inaktiviert. Sowohl Bordet als Ehrlich und Morgenroth nehmen an, daß im Tiere A ein Antikörper entstanden sei, der spezifisch gegen das Alexin (Komplement) vom Tiere B einwirke, und nennen diesen Antikörper Antialexin, Bordet, oder Antikomplement, Ehrlich und Morgenroth. Bordet hat weiter gezeigt, daß dieses Antialexin thermostabiler ist, als das gleichzeitig entstandene Präzipitin, und stützt dadurch weiter seine Auffassung, daß ein wirkliches spezifisches, Alexin neutralisierendes Antialexin existiert.

Durch die Untersuchungen von Gengou und später von Gay, Moreschi u. a. ist aber die Tatsache festgestellt<sup>1)</sup> worden, daß, wenn ein präzipitierendes Serum auf ein präzipitierbares einwirkt, wie in den oben genannten Versuchen von Bordet, Ehrlich und Morgenroth der Fall war, nicht nur das Alexin des präzipitierbaren Serums, hier also des Serums B, sondern auch alle anderen Alexine verschiedenen Ursprunges, welche eventuell in Kontakt mit dem Präzipitat gebracht worden sind, von diesem aufgenommen, inaktiviert oder abgelenkt werden. Dabei ist es gleichgültig, welches Eiweiß als präzipitinogen benutzt worden ist. Diese durch spezifische Präzipitate hervorgerufene nicht-spezifische Ablenkung kann eine wirkliche spezifische Neutralisation durch

1) Bordet hatte schon früher gezeigt, daß sensibilisierte Blutkörperchen und Mikroben das Alexin verankern können.

eventuelle echte Antialexine im Sinne Bordets und Ehrlichs vortäuschen. Diese Tatsache, daß also eine Abschwächung und ein Verschwinden des Alexins auch ohne Gegenwart eines gegen dasselbe gerichteten spezifischen Antialexins hervorgerufen werden kann, hat die Lehre von der Existenz der Antialexine erschüttert.

Weitere Untersuchungen haben noch gezeigt, daß die Verbindung zwischen Präzipitin und präzipitierbaren Sera, auch wenn so kleine Mengen derselben gebraucht worden sind, daß kein sichtbares Präzipitat entsteht (Moreschi, Liefmann u. a.), ein Verschwinden des Alexins bewirken kann. Eine Ablenkung des Komplementes hat man außerdem noch durch eine große Menge verschiedener Stoffe und chemischer Reaktionen hervorrufen können (Lingelsheim, Seligmann u. a.). Durch die Untersuchungen von Eisenberg wissen wir noch, daß die Entstehung des sichtbaren Präzipitates durch Erhitzen auf ca. 65° C aufgehoben wird und daß das bindende Vermögen des Präzipitins gegenüber präzipitierbarer Substanz erst bei ca. 70° C verschwindet, ein Ergebnis, welches die Beobachtung Bordets, daß das Präzipitin bei niedrigerer Temperatur zerstört wird als das supponierte Antialexin, auch ohne Annahme eines spezifischen alexinneutralisierenden Antikörpers, i. e. des sogenannten Antialexins, erklären kann.

Auf Grund seiner Untersuchungen zweifelt deshalb Moreschi an der Existenz der Antialexine. Er sagt: „Die antikomplementäre Wirkung tritt ausschließlich im Gefolge der Präzipitation auf und steht im engsten Zusammenhange mit dieser.“ — „Fehlen die Bedingungen zum Zustandekommen der Präzipitation (Gegenwart von Präzipitin und präzipitierbarer Substanz), so bleibt jede antikomplementäre Wirkung aus.“ — Daß eine „antikomplementäre“ Wirkung wirklich ausschließlich im Gefolge der Präzipitation entstehe, hat er jedoch nicht bewiesen, weil er nicht das Nichtvorhandensein der echten Antialexine bewiesen hat; ebenso ist es wohl zu viel gesagt, wenn er kategorisch behauptet, daß jede „antikomplementäre“ Wirkung ausbleibe beim Fehlen der Bedingungen zum Zustandekommen der Präzipitation. Wenn auch die Ablenkung des Alexins im Sinne von Gengou, Gay, Moreschi feststeht, so

folgt daraus gar nicht, daß kein echtes alexinneutralisierendes Antialexin existiert. Die Wirkung desselben kann ganz gut durch die Ablenkung verdeckt sein. Ein Teil des sichtbaren Alexinschwundes könnte ganz gut auf einer echten Alexinneutralisation beruhen, obwohl man eine solche nicht von der Ablenkung hat scheiden können. Man muß dagegen wohl Moreschi zustimmen, wenn er sagt, daß „der unzweifelhafte Nachweis echter Antikomplemente in dem bisherigen Sinne nirgends geführt worden ist“ — und „die durch Immunsere hervorgerufenen Präzipitationsvorgänge sind imstande, antikomplementäre Wirkungen vorzutäuschen, und bei allen bisher als antikomplementäre aufgefaßten und beschriebenen Erscheinungen ist diese Fehlerquelle nicht genügend berücksichtigt worden, so daß zur Zeit die Existenz von echten Antikomplementen noch nicht als bewiesen betrachtet werden kann“. Auch Sachs schließt sich dieser Auffassung an, indem er sagt: „Immerhin erscheint es bei der völligen Analogie zwischen Komplementen und Toxinen wahrscheinlich, daß bei der Immunisierung mit Komplementen Antikomplemente gebildet werden, nur stehen eben unter den gegebenen Verhältnissen der strikte Nachweis noch aus“, und weiter: „Es muß als eine offene Frage noch bleiben, ob echte Antikomplemente existieren“.

Die Auffassung, daß es in der Tat wahre alexinneutralisierende Antialexine gebe, hat auf viele Gebiete der Immunitätsforschung Einfluß geübt: das Verschwinden der Alexine durch Einwirkung des Antialexins hat z. B. Bordet in seinen Untersuchungen über die Spezifität der Alexine als Beweisgrund benutzt; Ehrlich hat seine grundlegende Theorie von der Konstitution der Alexine (daß diese aus hapto- und zymophoren Gruppen bestehen) zum Teil auf die Existenz der Antikomplemente begründet.

Auf Anregung des Herrn Dr. J. Bordet, der mir in seinem Laboratorium Platz gewährt und mir bei meiner Arbeit mit wertvollen Ratschlägen beigestanden hat, habe ich folgende Versuche angestellt, um die Existenz der echten Antialexine zu beweisen.

Der schwache Punkt der Antialexinlehre liegt offenbar

darin, daß man, wo keine Präzipitate entstehen können, eine Antialexinwirkung nicht hat zeigen können.

Wenn man ein inaktiviertes, auf 56° erhitztes Serum, welches Präzipitin und eventuell ein echtes Antialexin enthält, auf ein entsprechendes nicht inaktiviertes Serum einwirken läßt, so entsteht eine spezifische Bindung zwischen Präzipitin und präzipitabler Substanz, welche Bindung das Alexin ablenkt, so daß man nicht mehr eine eventuelle echte Antialexinwirkung beobachten kann. Ob das Verschwinden des Alexins nur auf Alexinablenkung und gar nicht auf Alexinneutralisation zurückzuführen ist, bleibt unentschieden.

Um zu untersuchen, ob echte Antialexine existieren, wird es deshalb notwendig, das Alexin von den präzipitablen Substanzen des Serums zu trennen, und die Frage stellt sich in folgender Weise: Kann ein solches von den präzipitablen Substanzen getrenntes Alexin von einem sogenannten Antialexinserum neutralisiert werden? Wenn eine Neutralisation stattfindet, existiert ein echtes Antialexin; wenn nicht, so ist die sogenannte Antialexinwirkung im ganzen wie eine Alexinablenkung durch Präzipitate zu verstehen.

Um das Alexin von den anderen Substanzen des Serums zu isolieren, kann man auf folgende Weise verfahren. Man läßt sensibilisierte Blutkörperchen auf das Serum einwirken. Diese nehmen das Alexin auf und isolieren dasselbe von den präzipitablen Substanzen des Serums. Ich nahm deshalb sensibilisierte Blutkörperchen, ließ diese Pferdealexin absorbieren, wusch die Blutkörperchen genau und untersuchte, ob das fixierte Alexin vielleicht durch Serum, welches eventuell echtes Antialexin enthielt, neutralisiert werden kann. Zwei Methoden können für solche Untersuchungen befolgt werden.

Erstens kann man sensibilisierte, mit Alexin beladene gewaschene Blutkörperchen mit Antialexinserum in Kontakt bringen und nach diesem Kontakt das Serum durch Zentrifugieren und Dekantieren von den Blutkörperchen trennen und mit Hilfe neuen Alexins untersuchen, ob das Antialexinserum einen Teil von seiner Kraft verloren hat.

Zweitens kann man die auf diese Weise behandelten Blutkörperchen nach dem Kontakt mit dem Antialexinserum untersuchen, um zu sehen, ob die Blutkörperchen durch die Einwirkung des Antialexinserums ihr Alexin verloren haben und durch die Einwirkung des Antialexins sozusagen geheilt worden sind, mit anderen Worten, ob das Alexin, welches sie genommen hatten, neutralisiert werden kann.

Hier wird man fragen: Wie kann man untersuchen, ob die sensibilisierten und alexinierten Blutkörperchen mit Hilfe des Antialexinserums von der Alexinwirkung frei werden? Man weiß ja, daß sensibilisierte Blutkörperchen, welche Alexin fixiert haben, hämolysiert werden. Wie kann man bei Gegenwart dieser unheilbaren Wirkung konstatieren, daß das Antialexinserum noch die Wirkung des Alexins unterdrücken kann? Hierbei kann man die eigentümlichen Eigenschaften der Pferdealexine benutzen.

Sensibilisierte Blutkörperchen, welche in Kontakt mit frischem Pferdeserum gebracht werden, fixieren das Alexin, bleiben aber intakt, sie werden nicht hämolysiert. Man kann auf diesem Wege Blutkörperchen erhalten, welche Alexin genommen haben, aber nicht hämolysiert worden sind.

Um zu zeigen, daß diese Blutkörperchen wirklich Alexin fixiert haben, genügt es, inaktiviertes Ochsen-serum zu den sensibilisierten und alexinierten Blutkörperchen hinzuzufügen.

Bordet und Gay haben nämlich gezeigt, daß im Ochsen-serum eine bei 56° C nicht inaktivierbare Substanz existiert, welche sie „Colloide de bœuf“ nennen und welche weder mit normalen, noch mit sensibilisierten Blutkörperchen sich fixiert, aber sensibilisierten Blutkörperchen, welche Alexin fixiert haben, sehr stark agglutiniert, welches zeigt, daß die Bindung des Pferdealexins sich vollzogen hatte. Sachs und Bauer sind nicht mit der Erklärung dieses Phänomens, welche Bordet und Gay gegeben haben, einverstanden, aber auch diese Autoren geben die Tatsache zu, daß Ochsen-serum die Fähigkeit alexinierte Blutkörperchen auszuflocken hat, welche Tatsache allein für meine Untersuchungen von Bedeutung ist.



Aus dem oben Gesagten geht ohne weiteres die zu befolgende Technik hervor.

Wenn man sensibilisierte Blutkörperchen in Kontakt mit Pferdealexin gebracht hat, das Alexin von den Blutkörperchen fixiert ist, und diese Blutkörperchen sorgfältig, um die anderen Substanzen des Pferdeserums, auch die präzipitablen Substanzen, zu vermeiden, ausgewaschen worden sind, so werden diese so behandelten Blutkörperchen beim Hinzufügen von inaktivem Ochsen Serum sehr stark agglutiniert. Diese Agglutination zeigt, daß die Blutkörperchen Alexin angenommen haben. Aber wenn man vor der Einwirkung des Ochsen Serums ein Antialexin Serum, in dem man die Existenz echter Antialexine supponiert hat, auf alexinierte Blutkörperchen einwirken läßt, und dabei sieht, daß diese Körperchen bei nachfolgender Behandlung mit Ochsen Serum nicht agglutiniert werden, so zeigt dieses Resultat, daß das Antialexin Serum imstande ist, die Einwirkung des Pferdekomplementes zu neutralisieren und es existiert ein echtes Antialexin. Wenn sie aber agglutiniert werden, kann die Existenz echter Antialexine auf diesem Wege nicht gezeigt werden. Der zweite Teil meiner Versuche basiert auf dieser Technik.

Drittens habe ich noch untersucht, ob sensibilisierte und alexinbeladene Blutkörperchen auf ein Antialexin Serum so einwirken können, daß dieses Serum sein Vermögen, neue sensibilisierte und pferdealexinbeladene Blutkörperchen im oben genannten Sinne zu heilen, verloren hat.

Der Versuch von Ehrlich und Sachs ist bekannt. Meerschweinchenblutkörperchen werden nicht von Pferdeserum hämolysiert. Inaktiviertes Ochsen Serum wirkt allein auch nicht. Zusammen rufen diese beiden Sera eine starke Hämolyse hervor. Bordet und Gay haben gezeigt, daß unter diesen Bedingungen auch eine starke Agglutination<sup>1)</sup> entsteht.

1) Ich benutze hier immer wie frühere Forscher das Wort Agglutination auch für diese Zusammenballung der Blutkörperchen, obwohl dieser Name gewissermaßen irreführend ist, da ja diese Zusammenballung doch nicht, wie Bordet und Gay zeigen, als eine gewöhnliche Agglutination zu betrachten ist.

Wenn man inaktives Antialexinserum zufügt vor dem Zufügen von Blutkörperchen, so hat die oben genannte Mischung keine Wirkung. Dieses könnte man entweder, wie Moreschi, nur als eine durch entstandene Präzipitate hervorgerufene Alexinablenkung erklären, oder als eine Folge von einer echten Alexinneutralisation oder noch als eine Folge von Zusammenwirken beider Faktoren. In Konformität mit dem oben Gesagten habe ich folgende Experimente angestellt.

## 1.

**Versuche über die Einwirkung der alexinbeladenen sensibilisierten Blutkörperchen auf supponiertes Antialexinserum.**

Gut gewaschene frische Ochsenblutkörperchen wurden mit  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $56^{\circ}$  C erhitztem Serum von Kaninchen, welche mit Ochsenblutkörperchen vorher immunisiert worden waren, behandelt. Sobald die Blutkörperchen auf diese Weise mit Kaninchenimmunsensibilisatoren beladen oder sensibilisiert worden waren, wurden sie nach Waschung in frisches Pferdeserum gebracht. Als das Pferdealexin von den Blutkörperchen genommen worden war, was immer kontrolliert wurde, wurde auch das Pferdeserum gründlich gewegewaschen. Nachdem wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $56^{\circ}$  C erhitztes Serum von mit Pferdeserum immunisierten Kaninchen, welches Serum also eventuell echte Antialexine enthalten sollte, zu den gewaschenen, mit Pferdealexin beladenen Blutkörperchen, welche durch wiederholte Waschungen von den präzipitablen Substanzen des Pferdeserums befreit worden waren, zugefügt. Nach genügendem Kontakt zentrifugierte ich die Flüssigkeit wieder ab und untersuchte die Antialexinwirkung derselben auf die gewöhnliche von Ehrlich angegebene Weise; mit Hilfe von neuen Meerschweinchenblutkörperchen, neuem Pferde- und inaktiviertem Ochsenblutserum kann man beobachten, ob das Antipferdealexinserum etwas von seiner ursprünglichen Stärke verloren hat.

Beispiel: In je zwei Zentrifuggläser, I und II, wurde 0,8 ccm gewaschenes Ochsenblut gebracht; in Gläschen I wurden 2,4 ccm auf  $56^{\circ}$  C erhitztes Antiochsenblut-Kaninchenserum

zugefügt, und in Gläschen II ebensoviel normalen auf 56 ° erhitzten Kaninchenserums. Nach 1/2-stündigem Kontakt wurden die Blutkörperchen durch Zentrifugieren und Waschen von den Bestandteilen des Kaninchenserums befreit. Im Röhrchen I hatte ich also sensibilisierte, im Röhrchen II ebensoviel normale Blutkörperchen. Jetzt wurde beiderseits 1,6 ccm frisches Pferdeserum und 2,4 ccm physiologische Kochsalzlösung<sup>1)</sup> zugefügt. Nach 3-stündigem Kontakt wurden die Flüssigkeiten durch Zentrifugieren und Dekantieren von den Blutkörperchen entfernt. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden nach ihrem Gehalt an Alexine mittelst des Ehrlichschen Versuches geprüft, wobei die Flüssigkeit von dem Röhrchen I, die von den sensibilisierten Blutkörperchen entfernt worden war, sich frei von Pferdealexin zeigte; die Flüssigkeit von dem Röhrchen II hatte dagegen nicht ihre alexinäre Stärke verloren. Ich hatte also das ganze Alexin aus 1,6 ccm Pferdeserum an die Blutkörperchen in Tube I verankert, in Röhrchen II waren die Blutkörperchen in dieser Hinsicht normal geblieben. Zu den jetzt wieder gut gewaschenen Blutkörperchen wurde in beiden Röhrchen 0,2 ccm auf 56 ° 1/2 Stunde erhitztes Serum von einem mit Pferdeserum immunisierten Kaninchen und 2,4 ccm Aqu. physiol. zugefügt. Nach 3-stündigem Kontakt in Zimmertemperatur wurden die Flüssigkeiten I und II abzentrifugiert und die Antialexinstärke beider auf die Weise geprüft (siehe Tabelle I), daß von beiden gleiche Mengen in einer Reihe von Röhrchen abpipettiert wurden. Zu diesen Röhrchen wurde frisches Pferdeserum in steigenden Mengen zugefügt. Nach einer Stunde wurden alle diese Röhrchen mit gleichen Mengen auf 56 ° erhitzten Ochsenserums und frischer Meerschweinchenblutkörperchen versetzt. Ich machte eine große Menge solcher Untersuchungen mit mehreren Pferdesera, Ochsen sera, Ochsenblutkörperchen von verschiedenen Tieren und mit 5 verschiedenen Kaninchenimmunsera, die eine „antialexinäre“ Wirkung im gewöhnlichen Sinne zeigten. Die Untersuchungen machte ich sowohl so, daß ich die Differenz der Flüssigkeitsmengen in den Röhrchen mit Kochsalzlösung korrigierte, wie auch ohne diese Korrektion.

1) Die Kochsalzlösung wurde immer 8,5 auf 1000 gemacht.

Tabelle I.

	Tube I ccm	Tube II ccm	Tube III ccm	Tube IV ccm	Tube V ccm
Schlußflüssigkeit aus Röhrchen I	0,25	0,25	0,25	0,25	—
Pferdeserum	0,05	0,1	0,15	0,2	0,05
Ochsen Serum 56°	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Meerschweinchenblut- körperchen	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Phys. Kochsalzlösung	0,15	0,1	0,05	—	0,40
Hämolyse nach 1/2 Std. bei 37° C	— <sup>1)</sup>	—	+ ?	+	++
Agglutination nach 1/2 Std. bei 37° C	—	+ ?	+	+	+
	Tube VI	Tube VII	Tube VIII	Tube IX	Tube X
Schlußflüssigkeit aus Röhrchen II	0,25	0,25	0,25	0,25	—
Pferdeserum	0,05	0,1	0,15	0,20	0,05
Ochsen Serum 56°	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Meerschweinchenblut- körperchen	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Phys. Kochsalzlösung	0,15	0,1	0,05	—	0,40
Hämolyse nach 1/2 Std. bei 37° C	—	—	+ ?	+	++
Agglutination nach 1/2 Std. bei 37° C	—	+	+	+	+

In diesem Versuche zeigten sich die Flüssigkeiten von beiden Röhrchen I und II fast ebenso wirksam. In beiden war die antialexinäre Stärke beinahe dieselbe. Wenn bei der einen Flüssigkeit keine Hämolyse zu sehen war, blieb sie auch bei der anderen aus. Doch muß ich betonen, daß in der Regel das antialexinäre Vermögen der Flüssigkeit I etwas abgeschwächt war, die Hämolyse war in den Tuben, wo diese Flüssigkeit benutzt worden war, gewöhnlich etwas stärker als in den entsprechenden Tuben mit der Flüssigkeit II. Doch war diese Differenz niemals so stark, daß man auf Grund derselben sicher hätte behaupten können, daß die Flüssigkeit I, welche im Kontakt mit den alexinbeladenen Blutkörperchen gewesen war, in erheblichem Grade ihre antialexinäre Stärke verloren hätte. Ähnliche Versuche, wie diese, wurden mehrere Male ge-

1) — bedeutet kein, + ? schwach, + deutlich, ++ stark.

macht, die Serummengen wurden verschieden variiert, aber immer zeigte das Antialexinserum, welches im Kontakt mit den alexinbeladenen Blutkörperchen gewesen war, fast dieselbe antialexinäre Stärke wie das Antialexinserum, auf welches die normalen, nicht mit Alexin beladenen Blutkörperchen eingewirkt hatten.

Dieses Ergebnis könnte ja ganz gut mit Moreschi so erklärt werden, daß eine wirkliche neutralisierende Antialexinwirkung nicht existiert, weil im obenstehenden Versuche das verankerte Alexin allein nicht die alexinäre Stärke des Immunserrums in deutlich sichtbarem Grade abgeschwächt hatte. Doch kann man auch an andere Erklärungsmöglichkeiten denken. Es wäre ja möglich, daß das verankerte Alexin sich anders verhält, als freies, so daß ein solches Alexin nicht mehr von den eventuellen Antialexinen neutralisiert werden konnte. Eine zweite Erklärungsweise wäre noch, daß das eventuell echte Antialexin einen so kleinen Teil der in gewöhnlicher Weise sichtbaren Antialexinwirkung ausübte, daß eine Abnahme der echten Antialexinstärke nicht in dieser Weise deutlich hervortreten kann, weil in dem oben angeführten Versuche die Ablenkung des Alexins durch eine spezifische Präzipitabildung bei der letzten Prüfung der Antialexinstärke des Immunserrums genügend stark war, um eine Abnahme der echten Antialexinstärke zu verdecken.

Weil ich also in den oben angeführten Versuchen nicht, wie ich erwartet hatte, eine sichere Abnahme der Antialexine des Immunserrums durch verankertes Alexin ohne Gegenwart von präzipitablen Substanzen konstatieren konnte, so folgt daraus nur, daß die ablenkende Eigenschaft der entstandenen Präzipitate die Hauptrolle bei der sichtbaren Antialexinwirkung zu spielen scheint. Die Existenz echter Antialexine wurde durch diese Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen.

## 2.

### **Versuche über die Einwirkung des supponierten echten Antialexins auf alexinbeladene sensibilisierte Blutkörperchen.**

Die Versuche wurden in Uebereinstimmung mit dem oben Gesagten auf folgende Weise gemacht. 4 Tuben wurden mit 0,05 ccm gewaschene Meerschweinchenblutkörperchen

versetzt. Zu jeder Tube wurde 1,0 ccm physiologische Kochsalzlösung und 0,3 ccm frisches Pferdeserum hinzugefügt. Nach 1-stündigem Kontakt wurden die Blutkörperchen gut gewaschen, durch Zentrifugieren und Dekantieren von den präzipitablen Substanzen des Pferdeserums befreit. Wie Klein, Bordet und Gay gezeigt haben, nehmen so behandelte Blutkörperchen mit Hilfe des Pferdesensibilisators das Pferdalexin auf. Die Blutkörperchen wurden also in allen Tuben sensibilisiert und mit Alexin beladen. Jetzt wurde in Röhrchen I und II 0,2 ccm durch Erhitzen bei 56° inaktiviertes Antialexinserum, welches im Verhältnis 1:10 das verwendete Pferdeserum inaktivierte, zugesetzt. In den zwei anderen Tuben, III und IV, wurde die gleiche Menge eines ebenfalls bei 56° inaktivierten Normalserums zugesetzt. Alle Tuben wurden mit 1,0 ccm physiologische Kochsalzlösung versetzt. Nach 1/2-stündigem Kontakt wurde in Tube I und III 0,3 ccm inaktiviertes Ochsen血清 zugesetzt. In Tube I war keine Veränderung zu sehen, die Blutkörperchen wurden gar nicht agglutiniert, so daß man keinen Unterschied zwischen den Tuben I und II sehen konnte. Dagegen zeigte die Tube III eine sehr deutlich hervortretende Veränderung: die Blutkörperchen wurden in einigen Minuten schon bei Zimmertemperatur sehr stark agglutiniert, so daß sie nach 5—10 Minuten ein einziges Klümpchen bildeten. Die Tube IV zeigte mit der Zeit bisweilen eine schwache Agglutination, doch war diese niemals zu vergleichen mit der in der Tube III. Die Blutkörperchen in den Tuben I und III waren mit dem inaktivierten Ochsen血清 versetzt, in der Tube I, wo die Blutkörperchen vor dem Zufügen des Ochsenserums in Kontakt mit Antialexinserum gewesen waren, zeigten sie keine Agglutination, in der Tube III dagegen, deren Blutkörperchen nur mit normalem inaktiven Kaninchenserum zusammengebracht worden waren, wurden die Blutkörperchen sehr stark agglutiniert. Dasselbe Resultat erhielt ich auch, wenn das Antialexinserum vor dem Zufügen des Ochsenserums gewegewaschen worden war. Die Agglutination in Tube III trat stark ein, auch wenn kein normales Kaninchenserum auf die Blutkörperchen eingewirkt hatte.

Wie können diese Befunde erklärt werden?

Alle Blutkörperchen waren gleichstark sensibilisiert und hatten die gleiche Menge Alexin genommen. Die Einwirkung des Antialexinserums konnte nicht auf eine Alexinablenkung zurückgeführt werden, weil die Blutkörperchen vor dem Zufügen von Antialexinserum gut gewaschen und also von den präzipitablen Substanzen des Serums befreit waren. Entweder wirkte das Antialexinserum als ein echtes Antialexin auf das verankerte Alexin ohne Mitwirkung der ablenkenden Präzipitatbildung, oder existierte in demselben ein Antisensibilisator gegen den normalen Pferdesensibilisator.

Um diesen letzten Einwand zu beseitigen, machte ich einige Versuche mit sensibilisierten Ochsen- und Pferdeblutkörperchen.

Mit Pferdeserum behandelte Ochsenblutkörperchen können nicht durch inaktiviertes Ochsenserum agglutiniert werden, aber wenn man diese Blutkörperchen mit einem sensibilisierenden Serum, z. B. Antiochsenblutkaninchenserum behandelt, so können die Blutkörperchen das Pferdealexin, wie es Bordet und Gay gezeigt haben, ohne hämolysiert zu werden, fixieren und werden jetzt bei Hinzufügen von inaktiviertem Ochsenserum sehr stark agglutiniert. Für die Ochsenblutkörperchen ist also in diesem Falle eine starke Agglutination mit inaktiviertem Ochsenserum ein Zeichen, daß sie Pferdealexin fixiert haben. Die Alexinbindung ist bei demselben nicht durch den normalen Pferdesensibilisator vermittelt, sondern durch den angewandten Immunsensibilisator des Kaninchenantiochsenserums. Wenn das Antipferdkaninchenserum auch in diesem Falle die Agglutination durch Ochsenserum verhindern könnte, wäre das ein Beweis für die Existenz der echten Antialexine. In diesem Falle könnten die eventuellen Antipferdsensibilisatoren nämlich nicht eine „heilende“ Wirkung gegen das Pferdealexin ausüben. In der Tat war auch dieses der Fall. Die sensibilisierten mit Pferdealexin beladenen Ochsenblutkörperchen, welche vor dem Hinzufügen von Ochsenserum mit Antipferdealexinserum behandelt waren, zeigten ein mit den Meerschweinchenblutkörperchen analoges Verhalten.



In zwei Tuben wurden gleiche Mengen (0,05 ccm) mit Antiochsenblutkaninchenserum behandelte gewaschene Ochsenblutkörperchen + 1,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gebracht, 0,2 ccm Pferdeserum wurde zugefügt, und nach 1-stündigem Kontakt wurde das Pferdeserum gut gewegewaschen. Nachdem die präzipitablen Substanzen des Serums so entfernt worden waren, wurde einerseits inaktiviertes Antipferdekaninchenserum, 0,2 ccm, und andererseits 0,2 ccm inaktiviertes normales Kaninchenserum, und beiderseits 1,0 ccm physiologische Kochsalzlösung zugefügt. Nach einer halben Stunde wurde beiderseits Ochsen Serum, 56° C, 0,3 ccm hinzugefügt, wobei nur die mit normalem Kaninchenserum in Kontakt gewesenen Blutkörperchen sehr stark agglutiniert wurden. Die in dem anderen Röhrchen blieben unverändert.

Die Pferdeblutkörperchen werden oft von inaktiviertem Ochsen Serum agglutiniert, aber es existieren auch solche Pferdeblutkörperchen, welche unter diesen Bedingungen gar nicht agglutiniert werden. Ich habe solche Blutkörperchen wiederholt gefunden, ungefähr 1mal auf 6mal. Solche inagglutinable Pferdeblutkörperchen wurden mit stark sensibilisierendem Antipferdeblutkaninchenserum behandelt. Mit solchen sensibilisierten Pferdeblutkörperchen kann der Ehrlichsche Versuch, ganz wie mit Meerschweinchen- oder sensibilisierten Ochsenblutkörperchen, gemacht werden. Mit Pferdealexin und inaktiviertem Ochsen Serum zusammengebracht, werden die sensibilisierten Pferdeblutkörperchen stark agglutiniert und hämolysiert, während Pferdeserum allein und Ochsen Serum allein nicht oder nur sehr schwach auf dieselben einwirken. Wenn solche sensibilisierte Blutkörperchen mit Pferdealexin behandelt werden, so nehmen sie ganz wie die Meerschweinchenblutkörperchen das Pferdealexin auf, ohne hämolysiert zu werden. Daß sie wirklich das Alexin genommen haben, kann man, wie Bordet und Gay es mit Meerschweinchen- und Ochsenblutkörperchen gezeigt haben, in deutlicher Weise mit Hilfe des Ochsen Serums demonstrieren. Die mit Alexin behandelten sensibilisierten Blutkörperchen werden von Ochsen Serum stark agglutiniert, vor der Sensibilisierung und Alexinaufnahme wurden sie nicht agglutiniert

Ohne Sensibilisierung konnten sie nicht aus dem Pferdeserum Alexin nehmen. Deshalb konnte ich zu meinen Versuchen über die Existenz der echten Antialexine mit sensibilisierten Pferdeblutkörperchen ganz analoge Versuche machen, wie die oben genannten mit den Meerschweinchen- und Ochsenblutkörperchen gemachten.

Sensibilisierte, dann gründlich gewaschene und mit Pferdealexin beladene Pferdeblutkörperchen wurden nach der Alexinbeladung gut gewaschen und in zwei Tuben gebracht. Einerseits wurde inaktiviertes Antipferdeblutkaninchenserum, dasselbe, welches zur Sensibilisierung der Blutkörperchen gebraucht worden war, zugefügt, andererseits normales inaktiviertes Kaninchenserum in gleicher Menge. Nach halbstündigem Kontakt wurde inaktiviertes Ochsenserum beiderseits zugefügt und mit demselben Resultate wie in den Versuchen mit Meerschweinchen- und Ochsenblutkörperchen. Da, wo das Antialexinserum auf die alexinbeladenen Blutkörperchen eingewirkt hatte, blieben die Blutkörperchen intakt; da, wo nur das Normalserum eingewirkt hatte, entstand immer eine außerordentlich starke Agglutination durch Ochsenserum. Bisweilen konnte ich auch bei diesen Blutkörperchen eine ziemlich ausgeprägte Hämolyse sehen, was die vorher mit Antialexinserum behandelten Blutkörperchen nicht oder nur sehr schwach zeigten.

In diesem Falle konnte nicht das Antialexinserum als ein Sensibilisator wirken, gleichzeitig Sensibilisator und Antisensibilisator für dasselbe Serum und dieselben Blutkörperchen sein, ist wohl unmöglich. Deshalb kann ich keine andere Deutung für diese Versuchsergebnisse finden, als daß hier die Antialexinwirkung nur von echten Antialexinen verursacht wurde. Da in meinen Versuchen der Unterschied in den verschiedenen Tuben sehr deutlich und groß war, sprechen diese Resultate also dafür, daß neben der ablenkenden Wirkung der Antialexinsera es auch eine echte Alexin neutralisierende Antialexinwirkung gibt, mit anderen Worten, die Frage, ob echte Antialexine existieren, mußte wohl mit ja beantwortet werden.

Um meinen Resultaten eine noch breitere Basis zu geben, machte ich ähnliche Versuche, wie die jetzt zitierten, auch mit Ziegen- und mit Immunserum sensibilisierten

**Meerschweinchen-Blutkörperchen.** Als Sensibilisatoren wurden auf 56° C erhitzte Sera von mit entsprechenden Blutarten behandelten Kaninchen benutzt. Als Antialexinserum wurde das Immunserum von 5 verschiedenen, teils nur mit Pferdeserum, teils mit Pferdeblut behandelten Kaninchen angewandt. Als Beispiel mag die Tabelle II auf p. 43 angeführt werden.

Wenn man diese Tabellen betrachtet, so findet man, daß in allen Fällen, wo Antipferdealexin zu den mit Pferdalexin beladenen und gewaschenen Blutkörperchen zugefügt wurde, das Ochsen血清 keine <sup>1)</sup> nennenswerte Veränderung bewirkte. Waren die Blutkörperchen nur mit normalem Kaninchenserum behandelt worden, so konnte eine durchgreifende Wirkung beobachtet werden. Die entstandene Hämolyse war doch immer nur mäßig ausgeprägt. Am stärksten zeigten die Pferdeblutkörperchen die Hämolyse, dann folgten die Ochsen- und Ziegenblutkörperchen. Die schwächste Hämolyse zeigten die Meerschweinchenblutkörperchen. Sehr oft versagte die Hämolyse vollständig. Ueberhaupt gab die hämolytische Wirkung des zuletzt zugefügten Ochsenserums nicht immer konstante Resultate. In der Regel verhielt sich die Hämolyse doch wie oben gesagt.

Die Agglutinationserscheinungen waren dagegen sehr konstant und auffallend stark bei allen den sensibilisierten und alexinierten Blutkörperchen, welche nicht mit Antialexinserum behandelt worden waren. Schon nach einigen Minuten in Zimmertemperatur wurden diese Blutkörperchen durch Ochsen血清 zu großen Flocken zusammengeballt, während die mit Antialexinserum behandelten keine Einwirkung des Ochsenserums zeigten. Oft waren diese letzten Blutkörperchen etwas agglutiniert schon durch das Antialexinserum, bisweilen konnte ein entgegengesetztes Verhältnis observiert werden; immer war das Endresultat dasselbe: starke Agglutination, wo nicht das Antialexinserum eingewirkt hatte, schwache oder keine da, wo dieses Serum gewirkt hatte.

Eine gewisse Schwierigkeit bereitet bei diesen Versuchen die oft schon bei der ersten Sensibilisierung entstehende

---

1) Bisweilen konnte eine schwache Hämolyse auch in diesen Röhrchen beobachtet werden, der Unterschied war jedoch immer sehr markant zwischen diesen und den Röhrchen, wo das Antialexinserum nicht gewirkt hatte.

Tabelle II.

	Gewaschene Pferdebloodkörperchen		Gewaschene Ochsenbloodkörperchen		Gewaschene Ziegenbloodkörperchen		Gewaschene Meerschweinchenbloodkörperchen			
	I	II	I	II	I	II	I	II	III	IV
Physiol. Kochsalz- lösung	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm	0,05 ccm
Antipferdeserum 56° C	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "	1,0 "
	0,2 "	0,2 "	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	—	—
Nach 1/2-stündigem Kontakt neue Waschung der Blutkörperchen und Zufügen von										
Physiol. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
Pferdeserum	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "
Nach 1-stündigem Kontakt neue Waschung und Zufügen von										
Physiol. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm
Antipferdeserum 56° C	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "	0,2 "
Normal. Kaninchen- serum 56° C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nach 1-stündigem Kontakt Zufügen von										
Ochsenserum	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm

Die Röhrchen wurden in den Thermostaten (37° C) gestellt, nach 1/2 Stunde herausgenommen und die Agglutination<sup>1)</sup> und Hämolysen abgelesen:

Hämolysen	keine	mäßige	keine	mäßige	keine	mäßige	keine	mäßige	keine	mäßige
Agglutination	unveränd.	starke	unveränd.	starke	unveränd.	starke	unveränd.	starke	unveränd.	starke

1) In den Röhrchen, welche "starke" und "sehr starke" Agglutination aufwiesen, konnte dieselbe schon nach einigen Minuten bei Zimmertemperatur beobachtet werden.

**Agglutination.** Die sensibilisierenden Sera mußten deshalb so viel wie möglich so gewählt und in solchen Dosen angewandt werden, daß die durch dieselben entstandene Agglutination durch Schütteln noch aufgehoben werden kann. Bei den Ochsenblutkörperchen ruft die Sensibilisierung keine Agglutination hervor, so daß die Versuche mit diesen Blutkörperchen gewissermaßen eine Kontrolle für die mit den anderen Blutarten gemachten sind. Da die Ochsenblutkörperchen, welche nicht bei der Sensibilisierung agglutiniert werden, ein analoges Resultat geben als die anderen, so können wohl alle die gemachten Versuche eine einheitliche Deutung erlauben.

Daß die Blutkörperchen gut sensibilisiert werden müssen, zeigt der Umstand, daß ich bei der Verwendung eines schwach sensibilisierenden Antipferdeblutkaninchenserums keine deutlichen Resultate erhalten konnte.

Wenn man in dem einfachen Ehrlichschen Versuche mit Meerschweinchenblutkörperchen ein altes Pferdeserum oder eine kleine Menge neues Pferdeserum benutzt, so bekommt man eine sehr schwach ausgeprägte Hämolyse. Natürlich kann das Serum so alt oder in so kleinen Mengen benutzt werden, daß auch keine Agglutination entsteht. Dieses mag nur deshalb erwähnt werden, weil in Alexinmangel vielleicht die Ursache zu suchen ist, warum meine Blutkörperchen überhaupt so schwach Hämolyse und so stark Agglutination zeigten. Obwohl das Pferdeserum immer frisch und in genügender Menge benutzt wurde, so waren vielleicht die Mengen des wirklich fixierten Pferdealexins zu klein, um Hämolyse zu geben, doch war wohl diese Ursache wahrscheinlich nicht von größerer Bedeutung. Die Hauptsache ist, daß die sensibilisierten Blutkörperchen nur dann von Ochsenserum agglutiniert werden, wenn sie Pferdealexin genommen haben, und daß diese Agglutination ausbleibt, wenn man die alexinbeladenen Blutkörperchen mit Antipferdealexinserum in genügender Menge und genügender Stärkevorbehandelt. Da in meinen Versuchen die Ablenkung durch präzipitable Substanzen durch sorgfältiges Waschen vermieden wurde, so scheinen

sie also für die Existenz der echten Antialexine zu sprechen.

Beim ersten Anblick scheinen diese Resultate im Widerspruch mit denjenigen von mir im Anfang referierten Versuchen über die Wirkung der alexinbeladenen Blutkörperchen auf Antialexinserum zu stehen. Ich konnte ja in jenen eine Abnahme der Antialexinstärke nicht mit Sicherheit konstatieren. In den jetzt angeführten war eine Einwirkung der präzipitablen Substanzen vollständig ausgeschlossen, in denjenigen wurde das Endresultat durch die unvermeidbare Ablenkung der Alexine getrübt. Doch zeigten ja auch die erst angeführten Versuche eine Tendenz in der Richtung, daß Antialexine aus der Flüssigkeit genommen wurde. Wenn man noch bedenkt, daß die Alexinneutralisierung nur ein Teil der sogenannten Antialexinwirkung sein kann, so ist der scheinbare Widerspruch zwischen den beiden Versuchsergebnissen auf ganz einfache Weise zu erklären.

\*       \*       \*

Man muß annehmen, daß bei der Neutralisierung der echten Antialexine, diese letzteren einem Substanzverlust unterworfen sein müssen. Wenn meine Resultate richtig sind, wenn echte Antialexine existieren, muß das Verschwinden oder die Abnahme des echten antialexinären Vermögens aus dem Serum durch Kontakt mit verankertem Alexin auch nachgewiesen werden können. Die Vorbedingung ist, daß auch bei der letzten Prüfung der Antialexinstärke des Serums die Alexinablenkung durch Präzipitate vermieden wird. Durch folgende Versuche ist es mir gelungen, auch hier die ablenkende Wirkung des Serums auszuschalten und dadurch zu zeigen, daß das Antialexinserum seiner echten Antialexine beraubt werden kann. Mit Hilfe großer Mengen sensibilisierter pferdalexinbeladenen Blutkörperchen kann man aus einem Antialexinserum die echten Antialexine absorbieren. Dieses Serum zeigt nach der Absorption noch eine starke antialexinäre Wirkung bei einem gewöhnlichen Ehrlichschen Versuche, weil die Ablenkung durch präzipitable Substanzen noch natürlich vorhanden ist; aber wenn man dieses Serum auf neue pferdalexinbeladene, gut gewaschene Pferde-

blutkörperchen einwirken läßt, so zeigt sich, daß das Serum seine „heilende“ Wirkung auf diesen verloren hat, das heißt, das verankerte Pferdealexin kann aus dem Serum die echte Antialexine entfernen oder neutralisieren, so daß das Serum jetzt nicht mehr durch sein echtes Antialexin wirkt, sondern nur durch Ablenkung der Alexine eine scheinbare Alexinneutralisierung zeigt.

Als Beispiel mag folgender Versuch angeführt werden (Tabelle III). Erstens wurden die Tuben I und II fertig gemacht; später wurden die Versuche mit den Tuben a, b, c, d, e und f gemacht. Die geeigneten Dosen müssen natürlich auch hier durch Vorversuche ausgesucht werden. Das benutzte Antipferdalexinserum war so stark, daß es im Verhältnis 1:10 eine starke antialexinäre Wirkung bei einem gewöhnlichen Ehrlichschen Versuche zeigte.

In diesem Versuche konnte im Röhrchen I (s. Tab. III) nur das echte Antialexin genommen werden. Im Röhrchen II hatte kein Komplement auf das Antialexin gewirkt, hier mußte das echte Antialexin geblieben sein. In beiden Röhrchen waren die präzipitierenden Substanzen zurückgeblieben. Im Röhrchen a waren die sensibilisierten und alexinbeladenen Blutkörperchen in Kontakt mit dem von echten Antialexinen eventuell befreiten Antialexinserum gebracht. Eine Ablenkung durch präzipitable Substanzen konnte nicht entstehen, weil die präzipitablen Substanzen gewaschen worden waren, und die Blutkörperchen zeigten sich beim Hinzufügen von inaktiviertem Ochsen Serum als nicht geheilt; sie wurden sehr stark agglutiniert. Im Röhrchen b waren die in analoger Weise behandelten Blutkörperchen in Kontakt mit derselben Menge des Antialexinserums gebracht, welches nicht seines Gehaltes an echten Antialexinen beraubt war. Hier wirkten die echten Antialexine noch, die Blutkörperchen wurden nicht durch inaktiviertes Ochsen Serum verändert, sie waren „geheilt“. Auch hier war doch eine ablenkende Einwirkung der präzipitablen Substanzen vermieden. Der Versuch zeigt also, daß das Antialexinserum sein echtes Antialexin durch Einwirkung des verankerten Pferdealexins ohne Gegenwart einer die Resultate durch präzipitable Substanzen ver-



Tabelle III.

Röhrchen I		II		a		b		c		d		e		f	
Pferdeblutkörperchen <sup>1)</sup>		1,0 ccm		0,05 ccm		0,05 ccm		Flüssigkeit I 0,2 ccm		Flüssigkeit II 0,2 ccm		Antipf.-Alex.-Ser. 0,02 ccm		—	
Antipferdeblut-Kaninchenserum 56°		3,0 "		0,2 "		0,2 "		Pferdeserum 0,2 "		0,2 "		0,2 "		0,2 ccm	
Normal. Kaninchenser. 56°		20,0 "		20,0 "		0,1 "		Physiol. Kochsalzlösung 1,0 "		1,0 "		1,0 "		1,0 "	
Kontakt 1/2 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.															
Physiol. Kochsalzlösung		20,0 ccm		20,0 ccm		1,0 ccm		0,05 ccm		0,05 ccm		0,05 ccm		0,05ccm	
Pferdekomp.-Serum		4,0 "		4,0 "		0,2 "		0,2 "		0,3 "		0,3 "		0,3 "	
Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.															
Physiol. Kochsalzlösung		1,8 ccm		1,8 ccm		Flüssigkeit I 1,0 ccm		Meersch.-Blut. 0,05ccm		0,05 ccm		0,05 ccm		0,05ccm	
Antipferdealexin-Serum		0,2 "		0,2 "		1,0 ccm		Ochsen-Ser. 56° 0,3 "		0,3 "		0,3 "		0,3 "	
Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren u. Dekantieren der Flüssigkeiten I und II.															
1/2 Stunde Thermostat 37° C.															
Hämolyse															
sehr schwach   sehr schwach   keine															
Agglutination															
sehr schwach   sehr schwach   keine															
1/2 Std. im Thermostat 37°															
Hämolyse															
ziemlich stark   unverändert															
Agglutination															
sehr stark   unverändert															

deckenden Alexinablenkung verlieren kann. Die Röhrchen c und d zeigen, daß von den Flüssigkeiten I und II viel kleinere Mengen genügten, um die Pferdealexine durch Ablenkung zu inaktivieren, so daß das Ochsen-serum die mit Pferdalexin beladenen Blutkörperchen nicht agglutinieren konnte. Die Röhrchen c und d zeigten nur eine unbedeutende und **gleich** starke Agglutination, welches zeigt, daß, obwohl die Flüssigkeit I ihr echtes Antialexin verloren hatte, die Flüssigkeit II nicht, doch der durch Ablenkung verursachte Alexinschwund in beiden so groß war, daß das Fehlen des echten Antialexins einerseits verdeckt wurde. Das Röhrchen e zeigt, daß die entsprechende Menge des Antialexin-serums genug war, um die, wie aus Röhrchen f hervorgeht, stark hämolysierende Alexinmenge vollständig zu neutralisieren. Aus dem Versuche folgt also, daß das echte Antialexin nur ein kleiner Teil der in gewöhnlicher Weise sichtbaren sogenannten Antialexinwirkung ist.

Noch mag hier folgender Versuch angeführt werden, welcher zeigt, daß die alexinbeladenen Blutkörperchen durch Antialexinserum ohne Mitwirkung der Alexinablenkung dauernd geheilt werden, so daß, auch wenn das Antialexin-serum vor dem Zufügen des Ochsen-serums gewegewaschen wird, die Blutkörperchen nicht von Ochsen-serum verändert werden. Die Details des Versuches gehen aus der Tabelle IV (p. 49) hervor.

Das Beispiel zeigt, daß die Blutkörperchen, auch wenn der Ueberschuß des echten Antialexins und die in dem Antialexinserum vorhandenen Präzipitine entfernt worden sind, soviel echtes Antialexin fixiert haben, was für die dauernde Neutralisierung nötig war. Nach beendigtem Versuche fügte ich noch einmal 0,2 ccm Pferdeserum zu den Röhrchen I und III. Jetzt entstand auch in diesen Röhrchen eine ziemlich starke Hämolyse und sehr starke Agglutination, welches zeigt, daß die Resistenz der Blutkörperchen auf Alexinmangel beruht. Dieselbe Einwirkung übt ein neues Zufügen des Pferdeserums, auch wenn das zugefügte Antialexinserum nicht gewegewaschen war, aber in diesem Falle müssen größere Mengen Pferdeserum benutzt werden, weil das nicht gewegewaschene Antialexinserum auf das neu hinzugefügte Pferde-

Tabelle IV.

Röhrchen I		II	III		IV
Pferdeblut- körperchen	0,05 ccm	0,05 ccm	Meerschwein- chenblutkör- perchen	0,05 ccm	0,05 ccm
Antipferdeblut- serum 56°	0,2 „	0,2 „	Pferdeserum	0,2 „	0,2 „
Phys. Kochsalz- lösung	1,0 „	1,0 „	Phys. Kochsalz- lösung	1,0 „	1,0 „
Kontakt 1/2 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.			Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.		
Phys. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm	Phys. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm
Pferdeserum	0,2 „	0,2 „			Norm. Kanin.- Serum 56°
Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.			Antipferdeblut- serum 56°	0,2 „	0,2 ccm
Phys. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm	Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren Waschen.		
		Norm. Kanin.- Ser. 56°	Phys. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm
Antipferdeblut- serum 56°	0,2 „	0,2 ccm	Ochsenserum 56°	0,3 „	0,3 „
Kontakt 1 Stunde, Zentrifugieren, Dekantieren, Waschen.			1/2 Stunde 37° C.		
Phys. Kochsalz- lösung	1,0 ccm	1,0 ccm	Hämolyse	keine	keine
Ochsenserum 56°	0,3 „	0,3 „	Agglutination	keine Ver- änderung	sehr stark
1/2 Stunde 37° C.					
Hämolyse	keine	ziemlich stark			
Agglutination	keine Ver- änderung	stark			

serum durch Präzipitierung stark ablenkend wirkt. Dagegen konnte ich in einem analogen Versuche mit anderen Alexine, z. B. Kaninchenalexin mit viel kleineren Mengen eine starke Hämolyse hervorrufen. Warum? Weil das Antipferdeserum weder durch Präzipitation und Ablenkung, noch durch Alexinneutralisation die Wirkung des Kaninchenserums aufheben konnte, eine Tatsache, welche für die Spezifität der echten Antialexine spricht.

Man könnte gegen die jetzt angeführten Versuche einwenden, daß die präzipitablen Substanzen des Pferdeserums von den bei der Sensibilisierung oft agglutinierten, mit Pferdalexin beladenen Blutkörperchen nicht vollständig gewaschen werden können; daß ein kleiner Teil der präzipitablen Substanzen des Serums nach der Waschung zurückgeblieben wäre, welcher genügen würde, um eine echte antialexinäre Wirkung zu simulieren. Gegen diesen Einwand mag erstens erinnert werden, daß ich die Waschungen mehrmals machte und bei jeder Waschung jede Spur der Flüssigkeit mittels Pipette von den Blutkörperchen entfernte. Zweitens war die ablenkende Stärke meiner Sera niemals eine sehr große. Die stärksten zeigten nicht in kleineren Mengen als 1:10 eine starke Ablenkung, so daß, wenn minimale Reste präzipitabler Substanzen auch zurückgeblieben wären, diese winzig kleinen Mengen doch nicht eine Ablenkung hätten verursachen können<sup>1)</sup>. Drittens wurden die Ochsenblutkörperchen beim Sensibilisieren gar nicht agglutiniert, die Waschung derselben war also eine vollständige und doch ergaben die Versuche mit diesen Blutkörperchen analoge Resultate wie mit den anderen Blutarten. Auch die Meerschweinchenblutkörperchen wurden nicht oder nur sehr schwach vom Pferdeserum agglutiniert und doch war das Resultat ein ähnliches. Noch möchte ich auf die Tabelle S. 47 aufmerksam machen. 1 ccm der Flüssigkeit I im Röhrchen a war nicht imstande, die Wirkung von 0,2 ccm Pferdeserum aufzuheben, und doch enthielt diese Flüssigkeit genug Präzipitin, um eine Ablenkung des Alexins durch eventuelle, in den Blutkörperchen gebliebene Reste der präzipitablen Substanzen des Pferdeserums hervorzurufen. Die Präzipitinmenge in 1 ccm Flüssigkeit I war gleich groß, wie in 0,1 ccm Antialexinserum, von welchem schon 0,02 ccm, wie das Röhrchen c zeigt, imstande war, die hämolysierende Wirkung von 0,02 ccm desselben Pferdeserums durch Ablenkung aufzuheben. Die Menge der präzipitierenden Substanzen im Röhrchen b war gleich groß wie im Röhrchen a; aber doch war das Resultat in dieser Tube umgekehrt. Dieses zeigt, daß die kleinen Mengen prä-

---

1) Eigentümlich wäre ja auch, wenn die Präzipitate ein schon fixiertes Alexin ablenken könnte.

zipitabler Substanzen des Pferdeserums, welche in den gewaschenen Blutkörperchen möglicherweise, theoretisch betrachtet, zurückgeblieben waren, die oben angeführten Resultate nicht trüben konnten.

Man könnte ja noch einwenden, daß die sensiblen Blutkörperchen neben Alexin einen anderen Stoff aus frischem Pferdeserum genommen hätten, welcher Stoff nicht gewegewaschen werden konnte und welcher mit inaktiviertem Ochsen Serum die eigentümliche starke Agglutination, Colloidreaktion von Bordet und Gay, hervorrief und welcher durch die „Antialexine“ neutralisiert werden könnte. In erhitztem Serum konnten die Blutkörperchen aber diesen Stoff nicht finden, dieser Stoff wurde wie die Alexine bei 56° C inaktiviert und konnte in keiner Weise von den Alexinen getrennt werden. Das Serum, welches mit sensibilisierten Blutkörperchen behandelt wurde, verlor diesen Stoff gleichzeitig, als es die Hämolyse hervorrufenden Alexine verlor. Aus diesen Gründen muß dieser Stoff als ein Alexin betrachtet werden und die gegen diesen Stoff gerichteten also als echte Antialexine.

#### **Zusammenfassung.**

Meine Versuche zeigen also, daß wenigstens gegen Pferdalexin ein echtes Antialexin zu existieren scheint; daß verankertes Alexin von diesen echten Antialexinen neutralisiert werden kann und daß diesem echten Antialexin nur ein kleiner Teil der totalen Antialexinwirkung zuzuschreiben ist. Wenn auch die Hauptrolle der in gewöhnlicher Weise sichtbaren Antialexinwirkung die Alexinablenkung im Sinne Gengous und Moerschis zu spielen scheint, so ist doch die Tatsache, daß auch echte Antialexine existieren für die theoretische Auffassung der Immunität von größter Bedeutung und deshalb sind alle die Untersuchungen, welche auf die Auffassung der Antialexinwirkung als nur eine Alexinablenkung oder als nur eine Alexinneutralisation gebaut sind, als nicht einwandfrei zu betrachten.

Brüssel, August 1908.

4 \*

**Literaturverzeichnis.**

- Bordet, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1899, 1900, 1903.  
 — Berl. klin. Wochenschr., 1906.  
 Bordet und Gay, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1906.  
 Bordet und Gengou, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1900, 1901.  
 Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., 1899.  
 Ehrlich und Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1902.  
 Eisenberg, Centralbl. f. Bakt., 1902.  
 Gay, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1905.  
 Gengou, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1902.  
 Liefmann, Berl. klin. Wochenschr., 1906.  
 Lingelsheim, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 42.  
 Moreschi, Berl. klin. Wochenschr., 1905.  
 — Berl. klin. Wochenschr., 1906.  
 — Berl. klin. Wochenschr., 1906.  
 Sachs und Bauer, Arbeiten aus d. Königl. Inst. f. exp. Therp., Frankfurt a. M. 1907.  
 Sachs, Die Hämolyse. Lubarsch-Ostertag Ergebnisse, Bd. XI, 1907.  
 Seligmann, Berl. klin. Wochenschr., 1907.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des Karolinischen  
 Institutes in Stockholm.]

**Ueber hitzebeständige, alkohollösliche, bakterizide Substanzen der Leukocyten.**

Von Dr. **Alfred Pettersson.**

Beim Suchen nach der Quelle der hämo- und bakteriolytischen Substanzen des Serums konnte Tarassewitsch (1) feststellen, daß die wässerigen Extrakte mehrerer Organe hämolytische Wirkung besaßen. Korschun und Morgenroth (2) unterzogen diese hämolytischen Stoffe einer eingehenden Untersuchung. Aus dieser ergab sich, daß sie sich in mehreren Beziehungen von den Hämolyseinen des Serums unterscheiden. Sie sind wenig löslich im Wasser, haften in den erwärmten Extrakten den Eiweißgerinnseln an, sind alkohol- und ätherlöslich, thermostabil, nicht komplex und rufen im Tierorganismus keine Antikörperbildung hervor. Levaditi (3) konnte die Angaben von Korschun und Morgenroth im allgemeinen bestätigen, doch fand er auch

wärmeunbeständige Substanzen in den Extrakten neben den thermostabilen hämolytischen. Ferner gelang es ihm, solche Stoffe im Kaninchenserum nachzuweisen. Später sind diese Substanzen des Serums von Wölfel (4) eingehend untersucht worden. Die aus dem getrockneten Serum mit Alkohol extrahierten hämolytischen Stoffe waren koktostabil. In Kochsalzlösung wurden sie nicht gelöst, sondern nur in der Flüssigkeit suspendiert und passierten deshalb nicht Chamberlandsche Kerzen. Die lösende Wirkung auf die Blutkörperchen einer Tierart wurde durch Zusatz vom Serum derselben Species aufgehoben, durch Zusatz anderer Sera nur geschwächt. Die wässrige Flüssigkeit vom bei 100° C koagulierten Serum ebenso wie dialysiertes, mit der gleichen Menge 1,6-proz. NaCl versetztes Serum hinderte auch die Hämolyse. Die weißen Blutkörperchen enthalten nicht diese hämolytischen Substanzen. Petroleumäther zieht die hämolytischen Stoffe aus dem getrockneten Serum nicht aus.

In einer Reihe Untersuchungen haben Landsteiner (5) und seine Mitarbeiter die Bedeutung fettartiger Substanzen der Zellen für die Cytolyse hervorgehoben. Unlängst ist auch die bakterizide Wirkung dieser Stoffe einer Untersuchung unterzogen worden. Daraus ging hervor, daß sowohl fettartige Substanzen bekannter Konstitution wie Oelsäure als ätherlösliche Teile wässriger Organextrakte bei Zusatz zum Serum als Komplement wirken können.

Eine thermostabile, alkohollösliche, auf Milzbrandbacillen wirkende Substanz konnte Bayer (6) in dem Froschovarium nachweisen. Sie ging erst bei etwas längerer Digestion ins wässrige Extrakt über.

Die bakteriziden Stoffe der Leukocyten treten erst nach großer Schädigung, wie z. B. Einfrieren, Erhitzen und Vergiften der Zellen aus diesen heraus. Von lebenden normalen Leukocyten werden sie nicht abgegeben und kommen unter normalen Verhältnissen weder im Plasma noch im Serum vor. Da sie in dieser Hinsicht große Aehnlichkeit mit den Endoenzymen und Endotoxinen zeigen, habe ich sie mit dem Namen Endolysine benannt.

Beim Studium der bakteriziden Substanzen der Leukocyten

fand ich, daß sie im allgemeinen in Alkohol bzw. Alkohol-Aether unlöslich sind (7). In einigen Fällen beobachtete ich aber nebst den alkoholunlöslichen auch alkohol- und ätherlösliche, keimtötende Stoffe. Auf die damals als Untersuchungsgegenstand benutzten Bakterien war die Wirkung meistens recht gering. Bisweilen war eine bakterizide Wirkung auch vom Alkohol- bzw. Aetherextrakt des Serums zu bemerken.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen sind ausschließlich mit den Bakterien der Hühnercholera ausgeführt worden. Den benutzten Stamm verdanke ich Herrn Prof. Svensson an der hiesigen Tierarzneihochschule. Er besaß von Anfang an nur geringe Virulenz, die sich aber erhöhen ließ. Da sie für diese Untersuchung nur geringe Bedeutung hatte, wurde sie gewöhnlich nicht über  $\frac{1}{100}$  Oese für Meerschweinchen getrieben. Wegen des großen Aufwandes von Tieren, um die nötigen Mengen Leukocyten zu erhalten, habe ich mich vorläufig auf diese Bakterie allein beschränkt. Die Extraktion wurde nur mit Alkohol allein, dafür aber unter wiederholtem Schütteln, mehrere Stunden bei  $+ 37^{\circ}$  ausgeführt. Trotz Verwendung reinsten Aethers kam es nämlich bisweilen vor, daß er beim Verdampfen einen Rückstand nachließ, der auf Hühnercholera bakterizid wirkte.

Serum und 2,0 g Leukocyten vom normalen Meerschweinchen. Von 0,5 g Leukocyten wurde durch Einfrieren Bouillonextrakt bereitet, die übrigen wurden mit Alkohol extrahiert. In jede Röhre 1 ccm.

Inhalt der Röhren	Keimzahl		
	sofort	nach 4 Std.	nach 10 Std.
Meerschweinchenserum		> 100 000	Vermehrung
Bouillon		> 100 000	"
Alkoholkontrolle		> 50 000	"
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-extrakt des Serums		> 100 000	"
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei $56^{\circ}$		> 100 000	"
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei $100^{\circ}$		22 896	"
Bouillonextrakte der getrockneten Alkohol-fällung des Serums		> 100 000	"
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-extrakt der Leukocyten	9158 bis 12783	6	0
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei $65^{\circ}$		1	0
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei $100^{\circ}$		0	0
Bouillonextrakt der mit Alkohol behandelten, getrockneten Leukocyten		> 100 000	Vermehrung



Serum und 2,5 g Leukocyten einer normalen Katze. 1 g Leukocyten wurden in gewöhnlicher Weise mit Bouillon extrahiert, die übrigen mit Alkohol 3 Stunden bei + 37° C. Auch das Serum wurde mit Alkohol behandelt.

Inhalt der Röhren	Keimzahl		
	sofort	nach 4 Std.	nach 10 Std.
Katzenserum		> 100 000	Vermehrung
Bouillon		> 100 000	"
Alkoholkontrolle		> 75 000	"
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-			
extrakte des Serums		> 50 000	"
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°		> 50 000	"
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100°		252	23
Bouillonextrakte vom getrockneten Al-			
koholniederschlag des Serums		> 100 000	Vermehrung
Bouillonleukocytenextrakte		> 100 000	"
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°		> 100 000	"
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-			
extrakte der Leukocyten		18	1
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°		240	76
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100°		0	0
Bouillonextrakt der mit Alkohol be-			
handelten, getrockneten Leukocyten		> 100 000	Vermehrung
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°		> 100 000	"

Wie aus den beiden wiedergegebenen Beispielen hervor-  
geht, kommt eine bakterizide Wirkung ausschließlich dem  
Alkoholextrakt zu. Der Niederschlag ist völlig wirkungslos.  
Es würde gewiß naheliegen, für diese Keimvernichtung Ver-  
unreinigungen des Alkohols selbst im Verdacht zu haben, zumal  
er nicht ganz ohne Rückstand verdampfte. Dieser wirkte aber,  
wie die Alkoholkontrolle zeigt, nicht einmal entwicklungs-  
hemmend. Daß diese Erscheinung nicht auf den Alkohol an-  
kommt, geht übrigens auch daraus hervor, daß die Alkohol-  
extrakte der Leukocyten nicht immer bakterizid wirken. Von  
den Leukocyten des Hundes und des Kaninchens habe ich  
bisweilen Alkoholextrakte erhalten, die vollständig wirkungslos  
waren. Dies ist eigentlich nicht überraschender, als daß die  
Serumbakterizidie bisweilen versagt (s. Tabelle auf p. 56 oben).

Von reinem Alkohol wurde keine vernichtende Wirkung  
auf kräftig wachsende Hühnercholera Bakterien bemerkt.

Die Aufschwemmung vom Alkoholextrakt der Leukocyten  
in Kochsalzlösung reagiert stets schwach, aber deutlich, sauer.  
Die Azidität ist aber nicht größer, als daß sie beim Auf-

2,5 g Leukocyten vom Hund in gewöhnlicher Weise mit Alkohol extrahiert.

Inhalt der Röhren	Keimzahl	
	sofort	nach 5 Std.
Bouillon	3376	> 50 000
Bouillonaufschwemmung vom Alkoholextrakt der Leukocyten		> 50 000
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°	bis	> 50 000
Dgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100°		> 50 000
Alkoholkontrolle	2925	> 50 000

schwemmen in gewöhnlicher, schwach alkalischer Bouillon immer aufgehoben wird. Die Bakterizidie kann sich folglich nicht darauf gründen. Dies geht mit größerer Gewißheit auch daraus hervor, daß das mit Natronlauge neutralisierte Extrakt immerfort bakterizid wirkt.

Von Kaninchenleukocyten wurden Extrakte teils mit Bouillon, teils mit Alkohol hergestellt. Nach Verdampfen des Alkohols wurde der Rückstand des Extraktes in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in zwei Teile geteilt und der eine mit Natronlauge neutralisiert. Sodann wurde jeder Teil mit der gleichen Menge Bouillon versetzt. Jeder Kubikcentimeter der fertigen Proben enthielt Extrakt von ungefähr 0,65 g Leukocyten.

Inhalt der Röhren	Keimzahl		
	sofort	nach 6 Std.	nach 11 Std.
Bouillon	17100	> 100 000	Vermehrung
Alkoholkontrolle		> 100 000	"
Bouillonleukocytenextrakt		> 100 000	"
Aufschwemmung vom Alkoholextrakt der Leukocyten		7	3052
Dgl. alkalisiert	12000	12	9

Im Gegensatz zur Bouillonaufschwemmung des Alkoholextraktes hat sich das Bouillonextrakt der Leukocyten unwirksam erwiesen. Um zu sehen, ob diese Erscheinung davon abhängt, daß die wirksamen Substanzen durch Bouillon bzw. Wasser nicht ausgelöst werden, wurden nach wiederholtem Einfrieren der Leukocyten mit destilliertem Wasser die Trümmer der Leukocyten vom Extrakt getrennt und die ersteren sodann mehrmals gewaschen. Die Leukocytenreste und das Extrakt wurden danach mit gleich großen Mengen Alkohol behandelt.

3,0 g Leukocyten vom normalen Kaninchen.

Inhalt der Röhren	Keimzahl		
	sofort	nach 6 Std.	nach 11 Std.
Bouillon	7500 bis 11200	> 100 000	Vermehrung
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-extrakt des Wasserextraktes		92	2862
Desgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°		94	0
Desgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100°		106	0
Bouillonaufschwemmung vom Alkohol-extrakt der Leukocytenrümmer		> 30 000	Vermehrung
Desgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°	7500 bis 11200	> 50 000	"
Desgl. erhitzt $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100°		24	576

Extrahierung mit Kochsalzlösung gab dasselbe Resultat. Die keimtötenden Substanzen sind in dem Kochsalz- bzw. Bouillonextrakt der Leukocyten tatsächlich vorhanden; ihre Wirkung dürfte aber durch andere in Alkohol unlösliche Stoffe aufgehoben werden. Zusatz von Bouillonextrakt des alkoholunlöslichen Restes der Leukocyten, ebenso wie von Serum, hebt auch die keimtötende Wirkung des Alkohol-extraktes auf.

Leukocyten vom normalen Meerschweinchen wurden mit Alkohol behandelt, von diesem durch Zentrifugieren getrennt, getrocknet, sodann etwa 2 Stunden mit Bouillon extrahiert und schließlich wiederum zentrifugiert. Das Alkoholextrakt wurde nach Verdampfen des Alkohols in Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde in drei Teile geteilt und zu diesen je gleich große Mengen Bouillon, Bouillonextrakt bzw. Serum zugesetzt.

Inhalt der Röhren	Keimzahl	
	sofort	nach 6 Std.
Bouillon	6100	> 100 000
Alkoholkontrolle	6100	> 100 000
Alkoholextrakt aufschwemmung + Bouillon	4500 bis 6100	8
Alkoholextrakt aufschwemmung + Bouillonextrakt der Leukocyten		> 100 000
Alkoholextrakt aufschwemmung + Meerschweinchen-serum		> 100 000

Die hemmende Wirkung dieser Stoffe wird durch das Erhitzen nicht aufgehoben. Zusatz von erhitztem Serum oder Extrakt hatte denselben Erfolg wie der von nicht erhitztem. Uebereinstimmend damit gelang es nicht durch Erhitzen die wässerigen Extrakte keimtötend zu machen. Auch nicht nach 24-stündigem Erhitzen bei 60° entfaltete das

Bouillonextrakt der Leukocyten jemals bakteriolytische Wirkung.

Es war natürlich sehr verlockend, der Natur der keimtötenden Stoffe etwas näher zu treten. Versuche wurden auch gemacht, festzustellen, ob sie in Petroleumäther löslich sind oder nicht. Bei 100° C vollständig getrocknete Leukocyten wurden in einem Soxhlet-Apparat mit bei + 50° kochendem Petroleumäther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Petroleumäthers wurde der Rückstand in Bouillon aufgeschwemmt. Er erwies sich als völlig unwirksam auf Hühnercholerabacillen. Das Bouillonextrakt des in Petroleumäther unlöslichen Teiles hatte aber als Regel auch keine keimtötende Wirkung. Da also ein bestimmter Unterschied zwischen den durch die Behandlung der Leukocyten mit Petroleumäther getrennten Teilen in bezug auf bakterizide Wirkung nicht gefunden wurde, und es sich weiter als gänzlich unmöglich zeigte, alle für die Extraktion nötigen Manipulationen steril auszuführen, so daß die Untersuchung der Proben auf Bakterizidie nur nach ihrem Erhitzen ausgeführt werden konnte, wurden diese Versuche bald aufgegeben, zumal der Aufwand von Tieren, um das nötige Untersuchungsmaterial zu bekommen, sehr beträchtlich war.

Obwohl eine genauere Kenntnis dieser Substanzen nicht erreicht werden konnte, dürfte man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen können, daß sie mit den von Korschun und Morgenroth in den Organextrakten entdeckten alkohol-löslichen hämolytischen Stoffen analog sind.

Unlängst ist aus dem Metschnikoffschen Laboratorium eine Arbeit von Korschun (8) über die bakterizide Wirkung der Leukocytenextrakte erschienen. Er hat darin im großen und ganzen bestätigen können, daß die gewaschenen Meer-schweinchenleukocyten keine bakterizide Wirkung auf *B. typhi* entfalten, während die Leukocyten vom Kaninchen keimtötende Stoffe enthalten. Weiter hat er den vollständigen Mangel der Leukocyten an Komplement für Typhusambozeptoren bestätigt. Schließlich hat er auch beobachtet, daß die keimtötende Wirkung der Leukocytenextrakte von inaktiviertem Serum geschwächt oder aufgehoben wird. Die ungünstige Wirkung des

erhitzten Serums auf die Intensität der Bakterizidie sowohl der Aufschwemmungen als auch der Extrakte der Leukocyten ist schon vor 3 Jahren von mir bei meinen Untersuchungen über die bakteriziden Leukocytenstoffe (9) gefunden worden. Ich habe sogar den Versuch einer Erklärung dieser Erscheinung gemacht. Beide scheinen Korschun aber völlig entgangen zu sein.

Korschun gibt nun zu, daß die keimfeindlichen Stoffe der Leukocyten in mehreren Beziehungen sich andersartig verhalten als die Serumbakteriolysine. Er gibt auch die Identität der bakteriziden Leukocytenstoffe mit den letzteren auf und nimmt statt dessen an, daß sie mit den von ihm und Morgenroth entdeckten alkohollöslichen hämolytischen Substanzen der Extrakte verschiedener Organe analog seien. Dies ist aber sicherlich unrichtig. Mit Alkohol kann man gewiß bisweilen bakterizide Substanzen aus den Leukocyten extrahieren, was aus meinen oben wiedergegebenen Versuchen hervorgeht. Diese wirken aber, meiner Erfahrung nach, nicht auf Typhusbacillen und ferner vor allen Dingen nicht in den wässerigen Extrakten der Leukocyten.

Die wirksamen bakteriziden Stoffe dieser Extrakte der Leukocyten sind nicht alkohollöslich, sondern werden, wie ich schon vorher nachgewiesen habe, im Gegenteil aus ihren wässerigen Lösungen durch Alkohol ausgefällt. Meine Untersuchungen beziehen sich freilich auf *B. proteus* und *B. anthracis* und nicht auf *B. typhi*, der zu diesen Versuchen nicht geeignet ist. Die auf die Typhusbacillen wirkenden keimtötenden Substanzen sowohl des Serums als der Leukocyten werden nämlich von Alkohol offenbar stark geschädigt (siehe die Tabelle auf p. 60).

Eine bakterizide Wirkung auf die Typhusbacillen entfalten die Extrakte der alkoholunlöslichen Teile nicht. Bisweilen zeigte jedoch das Bouillonextrakt des Alkoholniederschlages aus Serum eine mäßige Hemmung des Wachstums. Da der Alkohol für mehrere Enzyme kein unschädliches Behandlungsmittel ist, dürfte es berechtigt sein, anzunehmen, daß der Mangel an keimtötender Wirkung der Alkoholniederschläge von einer Schädigung der Komplemente herkommt und nicht davon, daß die keimfeindlichen Stoffe durch den Alkohol

Serum und ungefähr 3,0 g Leukocyten vom Kaninchen. Die eine Hälfte der Leukocyten wurde mit Bouillon, die andere mit Alkohol extrahiert.

Inhalt der Röhren	Keimzahl	
	sofort	nach 4 Std.
Einsaat: <i>B. typhi</i>		
Kaninchenserum		2
Bouillonaufschwemmung vom Alkoholextrakt des Serums	etwa 5000	> 50 000
Bouillonextrakt des getrockneten Alkoholniederschlags des Serums		> 50 000
Bouillonleukocytenextrakt		8
Bouillonaufschwemmung vom Alkoholextrakt der Leukocyten		> 50 000
Bouillonextrakt der alkoholbehandelten, getrockneten Leukocyten		> 50 000
Einsaat: <i>Proteus mirabilis</i> Sthlm.		
Kaninchenserum		2
Bouillonaufschwemmung vom Alkoholextrakt des Serums	etwa 1100	1 781
Bouillonextrakt des getrockneten Alkoholniederschlags des Serums		24
Bouillonleukocytenextrakt		0
Bouillonaufschwemmung vom Alkoholextrakt der Leukocyten		5 533
Bouillonextrakt der alkoholbehandelten, getrockneten Leukocyten		6

nicht ausgefällt werden. In jedem Falle fehlt der positive Beweis, daß die auf die Typhusbacillen wirkenden bakteriziden Leukocytenstoffe mit den von Korschun und Morgenroth entdeckten hämolytischen Substanzen analog sein würden, vollständig, denn sie werden mit Alkohol eben nicht ausgezogen.

Es ist natürlich völlig unmöglich, aus diesen groben Versuchen irgendwelche positive Schlußfolgerung zu ziehen, insofern es die Bedeutung der alkohollöslichen Stoffe der Leukocyten für die Vernichtung von Bakterien im Tierkörper angeht. Andererseits dürfte es aber keineswegs zulässig sein, aus der Unwirksamkeit der Bouillonextrakte etwas im negativen Sinne zu folgern. Es ist ja ohne weiteres klar, daß das Zellenprotoplasma mit dem Zellenextrakt nicht verglichen werden kann. Es wäre nicht undenkbar, daß die Substanzen, welche in dem Extrakt eine Hemmung der Bakterizidie hervorrufen, im Inneren der lebenden Zelle keinen solchen Effekt entfalten können.

### **Zusammenfassung.**

Die Leukocyten enthalten keimtötende Substanzen zweierlei Art.

Die einen bestehen aus alkohollöslichen kochbeständigen Körpern, deren Wirkung in wässrigen Extrakten durch gewisse alkoholunlösliche Stoffe aufgehoben wird.

Die anderen sind in Alkohol bzw. Alkohol-Aether unlösliche, komplexe, nicht kochbeständige Substanzen, die ihre Wirkung auch in wässrigen Extrakten entfalten. Da im allgemeinen mit Hämolyse- bzw. Bakteriolyse nur komplexe, alkoholunlösliche Körper gemeint werden, dürfte es angemessen sein, nur die letzteren der zwei oben genannten Substanzen der Leukocyten Endolysine zu nennen.

### **Literatur.**

- 1) Tarassewitch, L., Ann. Past., 1902.
- 2) Korschun und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., 1902.
- 3) Levaditi, C., Ann. Past., 1903.
- 4) Woelfel, Journ. of infect. Diseases, 1905.
- 5) Landsteiner und Ehrlich, Centralbl. f. Bakt. etc., Abt. I, Orig., Bd. 45. Dasselbst weitere Literaturangaben.
- 6) Bayer, G., Sitzungsberichte d. K. Akad. der Wissenschaften in Wien, Bd. 115, Abt. III.
- 7) Pettersson, A., Centralbl. f. Bakt. etc., Abt. I, Orig., Bd. 46.
- 8) Korschun, C. V., Ann. Past., 1908.
- 9) Pettersson, A., Centralbl. f. Bakt. etc., Abt. I, Orig., Bd. 39.

---

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz.]

### **Einige Versuche über die Rolle der Bakterienlipide bei der Phagocytose.**

Von Dr. Paul Th. Müller,  
Privatdozent und Assistent am Hygienischen Institut.

Die Aufmerksamkeit der Immunitätsforscher hat sich in der letzten Zeit in besonderem Maße den ätherlöslichen Bestandteilen der Gewebe und Körperflüssigkeiten zugewandt, die man mit einem bequemen Namen auch als Lipide zu bezeichnen pflegt. Man hat sich insbesondere die Frage vor-

gelegt, ob diesen Substanzen, denen man in der ersten Zeit nur wenig Beachtung schenkte, nicht doch eine größere Bedeutung für die Immunitätsphänomene zukomme, als man ursprünglich anzunehmen geneigt war, und eine ganze Reihe neuerer Arbeiten hat sich denn mit den Beziehungen dieser Stoffe zur Hämolyse, zur Bakterizidie, zu den toxischen und antitoxischen Phänomenen beschäftigt.

Es war daher nicht ohne Interesse, festzustellen, ob die Bakterienlipotide bei dem Vorgange der Phagocytose irgendeine Rolle spielen oder nicht. Auch von einem anderen Gesichtspunkt aus erschien diese Fragestellung berechtigt, denn Neufeld<sup>1)</sup> hat in einer seiner Studien über die Phagocytose vor kurzem die Ansicht ausgesprochen, daß „als unmittelbare Ursache der Phagocytose“ Reizstoffe anzusehen sind, die „von der Zelle, bevor sie der Phagocytose verfällt, abgegeben werden“, und es war daher wenigstens nicht undenkbar, daß diese Reizstoffe lipoider Natur sein könnten.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden drei verschiedene Versuchsanordnungen getroffen. Die erste bestand darin, daß die lipoiden Substanzen aus einer größeren Menge von Bakterienleibern extrahiert und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt wurden, und daß dann ermittelt wurde, ob ein Zusatz dieser Emulsion zu einem Gemisch von Leukocyten, Immunserum und (nicht entfetteten) Bakterien den Vorgang der Phagocytose irgendwie beeinflusse.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurde das Verhalten entfetteter Bacillen mit dem normaler verglichen, indem beide unter sonst gleichen Umständen mit Leukocyten und Immunserum zusammengebracht wurden.

Die dritte Versuchsanordnung endlich ging darauf hinaus, ebenfalls normale mit entfetteten Bacillen zu vergleichen, nur mit dem Unterschiede, daß nun die Aetherextraktion erst an den bereits sensibilisierten, mit Immunkörpern beladenen Bakterien vorgenommen wurde.

---

1) Neufeld, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 27, 1907.



Dies geschah besonders auch deshalb, weil Neufeld sich vorstellte, „daß durch ein cytotropes Serum das Bakterium bzw. die fremde Zelle, ohne im übrigen irgendwie geschädigt zu werden, in spezifischer Weise zur Abgabe des Phagocytose erregenden Stoffes angeregt wird, während bei der ‚spontanen‘ Phagocytose unter anderen Stoffen zufällig auch die besonderen Reizstoffe in Lösung gehen“. Es war daher — wenn man die Möglichkeit ins Auge faßt, daß diese Reizstoffe lipoider Natur sein konnten — wohl denkbar, daß dieselben erst nach Sensibilisierung der Bakterienzelle aus deren Gefüge genügend freigemacht wären, um in den Aether überzugehen, und daß daher diese dritte Versuchsanordnung andere Resultate ergeben konnte, als die zweite, bei welcher das Serum auf die schon entfetteten Bacillen einwirkt.

Im einzelnen gestalteten sich diese Versuche folgendermaßen: Agarmassenkulturen von *Bact. typhi*, die 48 Stunden lang bei 37° gehalten worden waren, wurden in möglichst geringen Mengen Leitungswasser aufgeschwemmt, die Aufschwemmung nach kurzem Absetzenlassen der gröberen Partikel (mitgerissenen Agarteilchen etc.) in 4 gleiche Teile geteilt und 2 von diesen in flachen Schalen bei einer 40° C nicht übersteigenden Temperatur im Vakuum eingetrocknet. Die beiden übrigen Emulsionen wurden mit gleichen Mengen hochwirksamen Typhusimmunserums (vom Pferde) versetzt, stehen gelassen, nach eingetretener Agglutination zentrifugiert, und die im Bodensatz befindlichen Bakterien mit möglichst wenig Flüssigkeit in flache Schalen gebracht und, wie die ersten beiden Proben, im Vakuum getrocknet. Der Inhalt je einer dieser beiden Schalenreihen wurde dann mit großen Aethermengen geschüttelt und über Nacht stehen gelassen, worauf der Aether abgegossen, erneut und nach mehrstündigem Stehen wieder abgegossen wurde. Die beiden anderen nicht mit Aether extrahierten Bacillenproben dienten als Kontrollen.

Zur Gewinnung der in den Aether übergegangenen Bakterienlipide endlich wurde derselbe einfach bei Zimmertemperatur abdunsten gelassen. Der Rückstand wurde dann zu

den Versuchen in physiologischer Kochsalzlösung zu einer fast homogenen Emulsion verteilt.

Die Leukocyten, die zu diesen Experimenten benutzt wurden, stammten vom Meerschweinchen und wurden durch Einspritzung von Aleuronataufschwemmung in die Bauchhöhle der Tiere und Entnahme des gebildeten Exsudates mittels Glaskapillaren gewonnen. Das Exsudat wurde mit großen Mengen Kochsalzlösung verdünnt und die Leukocyten daraus durch kurzes Zentrifugieren ausgeschleudert.

Die Versuche wurden im übrigen nach der von Bine und Lissner<sup>1)</sup> beschriebenen Methodik, in Glaskapillaren angestellt, wobei gleiche Volumina der Leukocyten- und Bakterienaufschwemmung sowie des Immunserums und eventuell noch des Bakterienextraktes in Verwendung kamen. Stets wurden alle Kombinationen doppelt angesetzt; nach ca.  $\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt im Brutschrank wurde der Inhalt jeder Kapillare auf 2 Objektträger gebracht. Fixiert wurden die Präparate mit Alkohol, gefärbt mit einem Gemisch von Methylenblau und Thionin (unter Zusatz von Karbolsäure und Formalin), das ich Herrn Dr. E. Knafl-Lenz verdanke, und das sich für den vorliegenden Zweck gut bewährt hat. Stets wurden bei der Durchmusterung der Präparate etwa 100 Leukocyten durchgezählt. Das Ergebnis der Zählungen ist in den folgenden Tabellen in der Weise notiert, daß 1) verzeichnet ist, wieviel Prozent der vorhandenen Leukocyten Phagocyten waren, d. i. bacillenhaltig angetroffen wurden, 2) wieviel aufgenommene Bakterien im Durchschnitt auf einen Leukocyten und 3) auf einen Phagocyten entfielen.

#### I. Versuche mit Bacillenextrakt.

25 ccm einer dichten Typhusbacillenaufschwemmung in 0,5-proz. Karbolsäurelösung, die außerdem 5 Proz. Milchzucker enthielt, wurden im Vakuum bei etwa 40° C eingetrocknet, gepulvert, mit Aether mehrmals extrahiert, der Aether bei Zimmertemperatur (nach Filtration) abdunsten gelassen und der Rückstand in ca. 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

---

1) München. med. Wochenschr., 1907.

## Versuch I.

a) 1 Teil Aetherextr. + 1 T. Ty-Bouillon + 1 T. Immunserum + 1 T. Leukocyten

b) 1 „ phys. NaCl + 1 „ „ + 1 „ „ + 1 „ „

c) 1 „ „ + 1 „ „ + 1 „ phys. NaCl + 1 „ „

Typhusbacillen: 24-stündige Kultur.

Leukocyten: 24h Aleuronatexsudat vom Meerschweinchen.

Immunserum: vom Kaninchen.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	12,4	0,7	5,5
b	12,9	1,0	8,0
c	6,0	0,24	3,9

## Versuch II.

Wie oben. Sehr wirksames Immunserum vom Pferd.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	29,2	2,7	9,4
b	19,5	1,3	6,6
c	7,4	0,3	4,2

## Versuch III.

Ty-Belag von 10 Agarflaschen, entsprechend etwa 60 gew. Agarkulturen, getrocknet und wie oben weiter behandelt. Der Aetherextrakt in 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	21,3	0,8	4,0
b	14,1	0,79	5,6

## Versuch IV.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	21,1	1,5	7,2
b	29,1	2,3	8,0

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. I.

5

Uebersichtstabelle.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a {	12,4	0,7	5,5
	29,2	2,7	9,4
	21,3	0,8	4,0
	21,1	1,5	7,2
Mittel	21,0	1,4	6,5
b {	12,9	1,0	8,0
	19,5	1,3	6,6
	14,1	0,79	5,6
	29,1	2,3	8,0
Mittel	18,9	1,3	7,0

Wie hieraus hervorgeht, hat also der Zusatz von Bacillen-Aetherextrakt zu dem System keinen merklichen Einfluß auf die Phagocytose ausgeübt; weder die Prozentzahl der Freßzellen unter den Leukocyten, noch die Menge der aufgenommenen Bakterien hat sich wesentlich verändert, und die geringen vorhandenen Differenzen liegen wohl zweifellos innerhalb der Versuchsfehlergrenzen.

## II. Versuche mit entfetteten Bacillen (Typhus).

Der Belag von je 3 Agarflaschen in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, im Vakuum bei ca. 40° C getrocknet<sup>1)</sup>; Probe a mehrmals mit Aether extrahiert, Probe b dient als Kontrolle. Von beiden wird eine möglichst gleich stark getrübbte Aufschwemmung hergestellt.

### Versuch I.

a) 1 Teil Leukoc. + 1 Teil Bakt. a + 1 Teil Immunserum

b) 1 „ „ + 1 „ „ b + 1 „ „

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	17,2	1,0	5,8
b	15,4	0,92	6,0

1) Es sei erwähnt, daß von mehreren in dieser Weise hergestellten Bacillenpräparaten einige sich als unbrauchbar erwiesen, indem, wie es scheint, plasmolytische Veränderungen an den Bakterien eingetreten waren, welche eine schlechte Färbbarkeit derselben bedingten.

## Versuch II.

Anordnung wie bei Versuch I.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	26,0	1,6	5,9
b	27,7	1,7	6,0

## Versuch III und IV.

(Neue Bakterienaufschwemmung.)

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a <sub>1</sub>	29,0	1,9	6,6
a <sub>2</sub>	29,3	1,8	6,2
b <sub>1</sub>	23,7	1,7	7,2
b <sub>2</sub>	26,1	1,9	7,1

## Versuch V.

Neue Bakterienaufschwemmung, wie bei Versuch I hergestellt.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	26,3	1,55	5,9
b	32,2	1,64	5,1

## Uebersichtstabelle.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	17,2	1,0	5,8
	26,0	1,6	5,9
	29,0	1,9	6,6
	29,3	1,8	6,2
	26,3	1,6	5,9
Mittel	25,6	1,6	6,1
b	15,4	0,9	6,0
	27,7	1,7	6,0
	23,7	1,7	7,2
	26,1	1,9	7,1
	32,2	1,6	5,1
Mittel	25,0	1,6	6,3
			5*

Auch diese zweite Versuchsanordnung, welche entfettete mit nicht entfetteten Bakterien in bezug auf ihre Aufnahme durch die Freßzellen vergleicht, hat, wie vorstehende Uebersichtstabelle zeigt, keinen Einfluß der lipoiden Bakterienbestandteile auf die Intensität der Phagocytären Vorgänge erkennen lassen. Entfettete Typhusbacillen wurden gleich gut phagocytiert wie die nicht entfetteten; man wird hieraus den Schluß ableiten dürfen, daß die Bakterienlipide — soweit sie durch unser Extraktionsverfahren zu entfernen sind — weder jene Reizstoffe darstellen dürften, welche nach Neufeld die Ursache der Phagocytose sind, noch auch mit jenen Zellbestandteilen identisch sein können, auf die die Opsonine (bezw. Tropine) einwirken; denn wäre letzteres der Fall, so müßte die Opsonierbarkeit der entfetteten Bakterien wesentlich geringer sein, als die der unversehrten.

### III. Versuche mit entfetteten sensibilisierten Bacillen (Typhus).

Der Belag von je 3 Agarflaschen in wenig physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt, mit je 10 ccm hochwirksamen Typhusimmunserums versetzt, zentrifugiert; der Bodensatz bei ca. 40° C im Vakuum getrocknet.

Probe a mit Aether extrahiert,

Probe b Kontrolle.

#### Versuch I und II.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a <sub>1</sub>	49,3	4,35	8,8
a <sub>2</sub>	52,5	4,4	8,4
b <sub>1</sub>	32,0	1,88	5,8
b <sub>2</sub>	37,0	2,3	6,4

#### Versuch III und IV.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a <sub>1</sub>	26,0	3,1	11,7
a <sub>2</sub>	24,8	3,6	14,0
b <sub>1</sub>	27,4	2,7	10,0
b <sub>2</sub>	25,0	1,9	7,5

Versuch V.  
(Neuhergestellte Bakterienaufschwemmungen.)

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	34,6	2,1	6,0
b	24,0	1,5	6,1

Uebersichtstabelle.

	Prozent der Leukocyten waren Phagocyten	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Leukocyt	Zahl der aufgenommenen Bakt. pro Phagocyt
a	49,3	4,4	8,8
	52,5	4,4	8,4
	26,0	3,1	11,7
	24,8	3,6	14,0
	34,6	2,1	6,0
Mittel	37,4	3,5	9,8
b	32,0	1,9	5,8
	37,0	2,3	6,4
	27,4	2,7	10,0
	25,0	1,9	7,5
	24,0	1,5	6,1
Mittel	29,1	2,1	7,2

.Betrachten wir endlich das Ergebnis der dritten Versuchsanordnung, bei welcher die Entfettung erst an den bereits sensibilisierten Bakterienleibern vorgenommen wurde, so fällt vor allem auf, daß die mit Aether behandelten Bacillen keineswegs in geringerem Maße von den Phagocyten aufgenommen wurden, als die nicht entfetteten. Daran also, daß durch die Aetherextraktion „Reizstoffe“ aus den Bakterien ausgezogen worden wären, daß diese Reizstoffe somit lipoider Natur wären, ist nach dem Ausfall dieser Experimente kaum mehr zu denken.

Ja, es zeigte sich sogar, daß die Phagocytose bei den entfetteten Typhusbacillen noch lebhafter ausfiel, daß sowohl die prozentische Zahl der Phagocyten als auch die aufgenommene Menge der Bakterien größer war, als bei den nicht mit Aether behandelten Kontrollbakterien, eine Tatsache, deren Erklärung ich übrigens derzeit noch nicht zu geben vermag. Möglich, daß es sich nur um ein zufälliges Versuchsergebnis

handelte; möglich auch, daß irgendwelche akzidentelle Ursachen, die ja zweifellos bei den phagocytären Vorgängen eine große Rolle spielen, mitgewirkt haben. So könnte man sich z. B. denken, daß durch die Aetherextraktion Bestandteile des Immunserums, die der Phagocytose entgegenwirken, entfernt worden seien usw. Es wird weiterer Versuche, besonders auch mit anderen Bakterienarten, bedürfen, um zu ermitteln, ob dieser Beobachtung eine Bedeutung zuzumessen ist oder nicht.

#### **Zusammenfassung.**

Vorläufig haben sich jedoch, um das Ergebnis der mitgeteilten Versuche nochmals kurz zusammenzufassen, keinerlei Anhaltspunkte dafür ergeben, daß den Bakterienlipoiden eine wesentliche Rolle bei den phagocytären Prozessen zuzusprechen wäre.

---

[Aus dem Georg-Speyer-Hause zu Frankfurt a. M.; Direktor:  
Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich.]

#### **Ueber Tryparosan.**

Von W. Roehl.

Mit chemischen Mitteln einen von Parasiten vollkommen durchwucherten lebenden Organismus mit einem Schlage von seinen Parasiten zu befreien und ihn dauernd zu sterilisieren: das gelang zum ersten Male Ehrlich und Shiga mit dem Trypanrot bei Mäusen, die mit den Trypanosomen des Mal de Caderas infiziert waren. Später fand man dann in dem Arsacetin und anderen Arsenikalien noch wirksamere Heilstoffe, und man kann jetzt jedes unserer gebräuchlichen Laboratoriumstiere von jeder noch so virulenten Trypanosomeninfektion dauernd heilen.

Damit ist jedoch die Aufgabe der experimentellen Chemotherapie noch nicht gelöst. Gewiß kann man mit Hilfe der Arsenikalien vollkommene Sterilisation erreichen, aber man muß oft zu Dosen greifen, die das Leben des infizierten Organismus unter Umständen gefährden. Niemals werden wirk-



same Medikamente für den Organismus ganz unschädlich sein können, und stets werden wir damit rechnen müssen, daß einzelne Individuen eine Idiosynkrasie gegen das gerade angewandte Medikament haben können.

Es gilt also, die Dosis herunterzusetzen und dennoch zu heilen. Dieses gelingt nur durch die Kombination zweier Heilmittel, die sich infolge differenter Verteilung im infizierten Organismus nicht in ihrer Giftwirkung für den Körper summieren können, sich dagegen in ihrer trypanoziden Funktion addieren, wenn sie an verschiedenen Rezeptoren des Trypanosomenprotoplasmas angreifen.

Ein derartiges Kombinationsmittel für die Therapie der Trypanosomeninfektion ist das Parafuchsin<sup>1)</sup>. Infolge der unermüdlichen Bereitwilligkeit und der liebenswürdigen Beihilfe des Herrn Dr. A. v. Weinberg war es ermöglicht, eine große Anzahl von Stoffen aus der Triphenylmethanreihe zu prüfen. In seinem Laboratorium (bei Leopold Cassella & Co.) stellte Herr Dr. Benda durch Einführung von Halogenresten speziell Chlor in das Parafuchsinmolekül wirksame Farbstoffe dar. So wurde durch Einführung von Chlor ein Farbstoff gewonnen, der dem einfachen Parafuchsin gegenüber einen wesentlichen Fortschritt bedeutet, er soll im folgenden als Tryparosan bezeichnet werden.

Zunächst ist das Tryparosan für Mäuse ungiftiger, noch nicht halb so giftig wie das Parafuchsin. Von diesem vertragen Mäuse höchstens Lösungen von 1:1000 bis 1:1200, wenn man pro 20 g Körpergewicht 1 ccm subkutan injiziert, dagegen wird von Tryparosan fast stets die Verdünnung 1:500 gut ertragen, erst 1:350 ist in der Regel tödlich. Die indurative Wirkung des Tryparosans ist gering, Hautnekrosen werden nur selten beobachtet im Gegensatz zu der starken indurativen Wirkung des Parafuchsins.

Der zur Infektion benutzte Trypanosomenstamm (Nagana) tötet die Mäuse meist nach 60—70 Stunden. Am 1. Tage nach der Infektion finden sich stets Trypanosomen in mäßiger Anzahl im Blute. Behandelt man an diesem Tage die Tiere

1) Ehrlich, Berl. klin. Wochenschr. 1907. Unabhängig davon war seinerzeit das gewöhnliche Fuchsin von Weber und Krause (Berl. klin. Wochenschr. 1907) als trypanocides Agens erkannt worden.

subkutan mit Tryparosanlösungen, die noch gut ertragen werden, so erzielt man stets dauernde Heilung, und das mit einer einzigen Injektion. Auch Dosen, die nur die Hälfte bis ein Drittel der tödlichen Dosis betragen, führen noch in 75 Proz. der Fälle zur Heilung, und selbst bei noch kleineren Dosen haben wir häufig endgültige Heilung durch eine einzige Injektion beobachten können.

Tabelle I.  
Subkutane Injektion von Tryparosan bei Mäusen.

Verdünnungen	Heilungen	Rezidive	% geheilt
$\frac{1}{500} - \frac{1}{850}$	5	0	100
$\frac{1}{750} - \frac{1}{1000}$	15	5	75
$\frac{1}{1250} - \frac{1}{1500}$	4	5	45
$\frac{1}{1000}$	1	4	25

Dagegen gelingt es mit Parafuchsin auch in den höchst ertragenen Dosen nur ganz ausnahmsweise, Heilung zu erreichen. Es ist also die Heilwirkung des Tryparosans im Vergleich zum Parafuchsin nicht nur deshalb günstiger, weil das Präparat ungiftiger ist und daher in größeren Dosen gegeben werden kann, sondern es wirkt auch in äquivalenten Mengen stärker.

Wie Ehrlich mitgeteilt hat, kann man das Parafuchsin als ölsaures Salz auch per os geben, und zwar mit günstigem Erfolge. Allerdings gelingt es auch auf diese Weise nicht, die bereits manifeste Blutinfektion bei Mäusen noch zur endgültigen Heilung zu bringen. Aber wenn man die Tiere einige Tage mit Parafuchsincakes vorfüttert und dann erst mit Trypanosomen infiziert, so ist in der Regel diese prophylaktische Fütterung ausreichend, um das Angehen der Infektion zu verhüten. Ehrlich hat auf Grund dieser Versuche das Parafuchsin als Prophylaktikum gegen die Schlafkrankheit empfohlen.

Das Tryparosan kann ebenfalls erfolgreich per os gegeben werden, am zweckmäßigsten als ölsaures Salz. Auch per os werden vom Tryparosan größere Dosen vertragen als vom Parafuchsin. Wir haben Mäuse nach der Cakesmethode mit Tryparosan gefüttert und mit der Behandlung erst begonnen, wenn die Mäuse soeben infiziert waren, und die Fütterung eine Woche lang fortgesetzt. Noch der vierte Teil der gut

ertragenen Dosis (0,045 g Farbbase pro Cake von 8—9) hat auf diese Weise stets die Infektion verhindert und selbst der neunte Teil in der Regel endgültig geheilt.

Tabelle II.

Tryparosanbehandlung von Mäusen nach der Cakesmethode.

Dosis der Farbbase pro Cake	Heilungen	Rezidive
0,03 g	12	0
0,02 "	5	0
0,015 "	5	0
0,01 "	6	0

Die Cakesfütterung begann gleichzeitig mit der Infektion, Dauer der Fütterung: 7 Tage.

Zum Vergleich mit Parafuchsin wurde eine Reihe von Mäusen infiziert und gleich nach der Infektion mit Farbstoffcakes behandelt, und zwar der eine Teil mit Parafuchsin-, der andere mit Tryparosancakes. Die Cakes enthielten je gleiche Mengen der Farbstoffe (0,005 g Farbstoffbase pro cake). Die Parafuchsinmäuse erkrankten sämtlich an Trypanosomen und starben, von den 6 Tryparosanmäusen erkrankte nur eine und starb, die 5 anderen wurden endgültig geheilt (Dauer der Fütterung 12 Tage). Dieser Versuch zeigt aufs deutlichste, daß man das Tryparosan nicht nur erfolgreich per os geben kann, sondern daß es auch hier dem Parafuchsin überlegen ist.

Es gibt noch eine andere Methode, um die Ueberlegenheit des Tryparosans über das Parafuchsin nachzuweisen: das ist mit Hilfe eines parafuchsinfesten Stammes. Wenn man einen Trypanosomenstamm durch Behandlung mit Parafuchsin hiergegen fest macht und einen solchen Stamm lange Zeit hindurch in Mäusen fortpflanzt, die stets mit Parafuchsin in möglichst hoher Dosis gefüttert werden, so stellt sich der Stamm schließlich auf die höchste Konzentration ein, die das Parafuchsin im Blute der lebenden Maus erreichen kann. Ein solcher im Verlauf von 3 Jahren gegen Parafuchsin maximal gefestigter Stamm wurde noch deutlich von Tryparosan beeinflusst, und es verschwanden nach subkutaner Injektion noch die Trypanosomen aus dem Blut auf einige Tage, wenn auch Heilung nicht erzielt werden konnte. Der parafuchsin-

festen Stamm war also gegen Tryparosan nur halbfest. Das Tryparosan hat demnach, wie zu erwarten, im Sinne Ehrlichs mit dem Parafuchsin den Angriffspunkt am Protoplasma der Trypanosomen gemeinsam, besitzt aber eine intensivere Wirkung (größere Affinität zu den Chemorezeptoren der Zelle).

Es ist übrigens, wie vorausszusehen, gelungen, den Parafuchsinstamm durch mehrfache Behandlung mit Tryparosan auch hiergegen vollkommen fest zu machen.

Eine höchst eigentümliche Erscheinung beobachteten wir bei infizierten Mäusen, die mit den beiden erwähnten Farbstoffen der Fuchsinreihe behandelt waren.

Die Infektion der Mäuse mit unserem gewöhnlichen Trypanosomenstamm verläuft, wie bereits gesagt, stets höchst akut. Auch wenn bei ungenügender Behandlung ein Rezidiv auftritt, so führt auch dieses in der Regel in wenigen Tagen zum Tode unter progredienter Vermehrung der Parasiten.

Anders verhielt es sich nicht selten, wenn die primäre Infektion mit Parafuchsin oder Tryparosan behandelt worden war. Es nahm dann die Infektion einen chronischen Charakter an, d. h. das auftretende Rezidiv führte nicht gleich zum Tode, sondern die Infektion zog sich lange hin, es fanden sich tagelang nur spärliche Parasiten im Blute, allmählich kam es zu stärkerer Vermehrung, mehrere Tage hindurch war die Zahl der Trypanosomen im Blute ungemein groß, aber plötzlich konnte wieder kritisch ein spontanes Verschwinden der Parasiten aus dem Blute erfolgen und die Maus relativ lange noch am Leben bleiben. So lebte eine Maus, die nach einer ungenügenden einmaligen Tryparosaninjektion ein Rezidiv bekam, über ein halbes Jahr mit äußerst wechselndem Parasitenbefund.

Besonders häufig beobachteten wir diese Änderung des Infektionsverlaufes, wenn die Behandlung der primären Infektion mit Parafuchsin eine ziemlich intensive war und trotzdem ein Rezidiv eintrat. Aus der Tabelle geht hervor, daß von 4 Mäusen, die mindestens 3 Tage vor der Infektion mit Parafuchsin vorgefüttert waren und ein Rezidiv bekamen, 3 in chronischer Weise erkrankten, während bei 11 anderen, nur höchstens 2 Tage vorgefütterten die Rezidive stets akut verliefen.

Tabelle III.  
Prophylaktische Parafuchsinfütterung bei Mäusen.

vorgefüttert Tage	Anzahl der Mäuse	davon		Krankheitsverlauf
		geheilt	erkrankt	
9—10	16	15	1	chronisch
5	3	2	1	akut
3—4	3	1	2	chronisch
2	3	1	2	akut
1	10	3	7	"
0	3	1	2	"

Die Cakes enthielten je 0,03 g Farbstoffbase, die Mäuse wurden nach der Infektion noch 5—6 Tage mit Cakes gefüttert.

Der chronische Infektionsverlauf ist dadurch bedingt, daß die mit Fuchsin behandelten Trypanosomen eine biologische Veränderung, eine Mitigation, erleiden. Es geht dies deutlich daraus hervor, daß die Uebertragung solcher mitigierten Trypanosomen auf normale Mäuse auch bei diesen in der Regel zu einem chronischen Krankheitsverlauf führt. Bei solchen Versuchen haben wir sogar einige Fälle beobachtet, in denen nach einer Reihe spontan auftretender und wieder verschwindender Rezidive endlich völlige Heilung eintrat, es blieb das Blut dieser Tiere nach dem letzten Erscheinen der Parasiten 5—7 Monate lang dauernd trypanosomenfrei, obgleich das Blut fast täglich untersucht wurde.

Wie auch Browning<sup>1)</sup> hier gefunden hat, verschwindet allmählich der mitigierte Charakter derartiger Trypanosomenstämme bei weiteren Passagen in Mäusen.

Browning hat nachgewiesen, daß man auch durch Behandlung mit Parafuchsin in vitro Mitigation der Trypanosomen erhalten kann, daß also damit infizierte Mäuse chronisch erkranken.

Dagegen gelingt es niemals, mit anderen trypanoziden Agentien eine derartige biologische Aenderung der Trypanosomen zu erreichen. Es stehen daher in dieser Hinsicht die

1) Brit. Med. Journ., 16. Nov. 1907 u. Journ. of Path. and Bact., Vol. XII, 1908, p. 166.

wirksamen Farbstoffe der Triphenylmethanreihe ganz isoliert und unerreicht da.

Diese höchst eigenartige Mitigation der Trypanosomen durch die Fuchsine muß dazu auffordern, sie auch bei der menschlichen Trypanosomiasis, der Schlafkrankheit, anzuwenden, natürlich in möglichst großer Dosis.

Derartige Versuche sind bereits im Gange und wir behalten uns vor, später auf diesen Gegenstand zurückzukommen.

Jedenfalls kann man wohl dies voraussagen, daß das Tryparosan mit den wirksameren Arsenpräparaten nicht wird konkurrieren können. Aber infolge seiner eigenartigen mitigierenden Wirkung, infolge eines anderen Angriffspunktes am Rezeptorenapparat der Trypanosomen und infolge seiner differenten Verteilung im Organismus kommt es als wichtiges Kombinationsmittel in Betracht. Das wird wohl der Platz sein, den es im Kampfe gegen die Schlafkrankheit wird einnehmen können.

#### **Zusammenfassung.**

Das Tryparosan, ein Chlorderivat des Parafuchsins, ist diesem an Heilwirkung bei der Trypanosomeninfektion überlegen. Das Tryparosan ist ungiftiger und es gelingt, nagana-kranke Mäuse mit einer einzigen subkutanen Injektion dauernd zu heilen. Sehr günstige Heilresultate wurden durch Verfütterung des Farbstoffes erzielt. Der gegen Parafuchsin maximal gefestigte Stamm wurde von Tryparosan noch beeinflußt.

Parafuchsin und Tryparosan bewirken häufig eine Mitigation der Trypanosomen, so daß mit solchen infizierte Mäuse in chronischer Weise erkranken. Eine derartige Mitigation wurde außer bei den Farbstoffen der Triphenylmethanreihe bei anderen Medikamenten nicht beobachtet. Es kommt daher das Tryparosan als Kombinationsmittel gegen Trypanosomeninfektion (speziell Schlafkrankheit) in Betracht.

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut in Wien;  
Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf.]

**Ueber den Einfluß künstlicher Aenderungen im Bakterien-  
protoplasma auf dessen agglutinogene Fähigkeiten.**

Von Dr. **Oswald Schwarz**,  
Operateur der Klinik Hofrat v. Eiselsberg.

I.

Bald nach Entdeckung der Bakterienagglutination zeigte es sich, daß die Fähigkeit, Antikörper zu erzeugen, auch abgetöteten Bakterien zukommt, also keineswegs eine Funktion der Struktur der lebenden Zelle ist. Vidal und Siccard, Chantemesse, Van de Velde u. s. w. zeigten, daß nicht nur bestimmte Temperaturen, sondern auch die Behandlung der Bakterien mit Formol, Thymol, Phenol, Chloroform u. s. w. ihre agglutinogene Fähigkeit nicht zerstört. Die ursprüngliche Zellimmunitätsreaktion stellte sich hiermit als eine Reaktion auf das Bakterienprotoplasma dar, und das Problem der Spezifität der Reaktion führte gleichsam zurück auf die Frage nach den feinsten Konstitutionsunterschieden der als Antigen verwendeten Eiweißkörper.

Während eine Reihe von Forschern die Konstitution der reagierenden Substanzen im Sinne der Ehrlichschen Theorie durch Nachweis einer mehr minder großen Zahl von funktionierenden „Gruppen“ zu charakterisieren suchten, gingen andere Untersucher darauf aus, die antigene Substanz als chemisches Individuum zu fassen. In Anbetracht der verschiedenen Methoden führten diese Versuche auch zu untereinander recht verschiedenen Resultaten.

Zunächst zeigten mehrere Autoren (Vidal, Durham u. a.), daß auch Kulturfiltrate wirksam sind. Nicolle (1) isolierte dann aus diesen einen in Alkohol-Aether löslichen Körper. Winterberg (2) hingegen fand die wirksame Substanz im Alkoholniederschlag. E. P. Pick (3) klärte diesen Widerspruch damit auf, daß er aus alten Kulturfiltraten einen alkoholunlöslichen Körper, aus jüngeren einen alkohollöslichen darstellen konnte, der auch in Kochsalzextrakte übergang. Rodet und Lagrifoul (4) konnten mit beiden Körpern

Agglutinin erzeugen, ebenso Brieger und Meyer (5) mit Ammonsulfatniederschlägen aus Kulturen.

Bei seinen Bemühungen, den Immunkörper von anhaftenden Beimengungen tunlichst zu befreien, konnte Pick die agglutinogene Substanz als einen von den nativen Eiweißkörpern recht weit entfernten Körper charakterisieren; ein biuretfreies Präparat, das auch keine Millonsche Reaktion mehr gab, wirkte auch nicht mehr antigen. Carega (6) stellte aus Colibacillen ein Nukleoalbumin dar, mit dem er noch erfolgreich immunisierte.

Auch in ihrem Verhalten gegen Erhitzen erwies sich die biologische Konstitution der agglutinogenen Substanz als eine komplizierte, indem Joos (7) eine thermolabile Komponente von einer thermostabilen trennen konnte. In bezug auf die Resistenz der Koaguline in Kochsalzextrakten gegen Temperatureinflüsse bestehen Differenzen in den Angaben von Pick und von Kraus und Joachim (8), die in dem verschiedenen Grade der Reinheit der beiden Präparate ihren Grund hatten; diese Tatsache ist auch deshalb interessant, weil man daraus ersehen kann, wie verschiedene Eigenschaften der agglutinogenen Substanz durch ihre chemische Zusammensetzung beeinflußt werden, wie dies zum erstenmal bereits aus den lichtvollen Ausführungen Paltaufs (21 u. 23) über den Einfluß der jeweiligen Zusammensetzung des Bakterienprotoplasmas resp. dessen physikalischen und chemischen Zustandsänderungen auf die Beschaffenheit — „Reaktionsbreite“ — des bezüglichen Immunserums hervorgeht. Hierher gehört auch die Beobachtung von Passini (9), daß das Serum, das mit Buttersäurebacillen hergestellt war, außer diesen auch Gasphlegmonebacillen agglutinierte, aber nur, wenn diese in analogen Vegetationsformen sich befanden. Endlich stellte Glässner (22) Untersuchungen an über den Einfluß verschiedener Zusätze zu den Nährböden auf verschiedene Eigenschaften der Bakterien. Er fand unter anderem, daß die Bildung von Agglutinogen deutlich von der Art des Stickstoffgehaltes der Nährböden beeinflußt wird, indem auf aminosäurehaltigen Nährböden gewachsene Bakterien am wenigsten Agglutinogen produzierten, auf eiweißhaltigen Nährböden gezüchtete dagegen am reichlichsten.



Einen tieferen Einblick aber in die hier maßgebenden Verhältnisse gewährten Untersuchungen, die mehr die quantitative Seite des Vorganges berücksichtigten. Denn da alle biologischen Reaktionen Gruppenreaktionen sind, mußten sich eventuell vorhandene Differenzen am deutlichsten in der Höhe der noch wirksamen Serumverdünnungen zeigen.

Joos gab als erster an, daß durch Injektion von auf 60° erhitzten Bakterien ein höherwertiges Serum zu erzielen sei als mit nativen Bakterien. Kraus und Joachim untersuchten die verschiedenen oben erwähnten antigenen Substanzen auf ihre immunisatorische Fähigkeit und erzielten den niedrigsten Agglutinationswert bei Injektion von Kochsalz-extrakten (1:50), den höchsten mit erwärmten Bakterien (1:1400). Porges (10) untersuchte den Einfluß der Temperaturen, denen die Bakterien vor der Injektion ausgesetzt waren, genauer und fand bei Seris, die mit auf 60° resp. 80° und 100° erhitzten Bakterien erzeugt waren, eine deutliche spezifische Wirkung auf die entsprechenden Bakterien. Es wurden hiermit weitgehende Analogien mit Verhältnissen aufgedeckt, wie sie Obermayer und Pick (11) schon früher für die Präzipitine gefunden hatten.

Ueber Aufforderung des Herrn Doz. E. P. Pick stellte ich nun Versuche an, die entscheiden sollten, ob bei bestimmten Aenderungen der Konstitution der antigenen Substanz auch eine Spezifität des Reaktionsproduktes sich erzielen lasse, und wie weit bei Anwendung möglichst schonender Eingriffe diese Differenzierung ginge.

## II.

Zunächst wurde der Einfluß der Fällung mit Schwermetallsalzen auf das Bakterienprotoplasma untersucht, und zwar wurden Bleiacetat, Sublimat, Eisenchlorid und Silbernitrat hierzu verwendet.

Die Fällung von Kolloiden durch Schwermetalle ist ein irreversibler Prozeß, d. h. das gefällte Kolloid kann nicht mehr wie nach der Fällung mit Leichtmetallen in den ursprünglichen Lösungszustand zurückgeführt werden. Löst man aber den Niederschlag im Ueberschuß des Fällungsmittels oder des Kolloids wieder auf, so erhält man eine

Lösung, deren physikalische Charaktere mit höchster Wahrscheinlichkeit darauf hinweisen, daß das Kolloid in Form neuer, eigenartiger Molekülkomplexe in Lösung gegangen ist (Pauli, 12).

Die hier gestellte Aufgabe war nun, zu untersuchen, ob sich diese Konstitutionsveränderung auch im biologischen Versuche durch Produktion charakteristischer, d. h. spezifischer Reaktionsprodukte manifestiert. Da alle chemischen und hiermit auch die biologischen Reaktionen „Gruppenreaktionen“ sind, war hier zunächst zu erwarten, daß sich die Reaktion der mit Metallbakterien erzeugten Sera auf Bakterien, die mit irgendwelchen Schwermetallen vorbehandelt waren, von der auf native oder sonstwie veränderte Bakterien unterscheiden würde, und umgekehrt Sera, die durch Vorbehandlung mit nativen Bakterien gewonnen waren, auf diese anders reagieren würden als auf Metallbakterien. In zweiter Linie konnte sich dann auch eine mehr minder spezifische Wirkung eines Serums auf die zur Immunisation verwendete Bakterienfällung zeigen.

Zunächst noch einige Worte zur Methodik:

24-stündige Agarkulturen eines gut agglutinierenden Typhusstammes wurden mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und mit einigen Tropfen der wäßrigen Lösung des betreffenden Metallsalzes versetzt. Mit Ausnahme der Eisenbakterien, die als voluminöser, flockiger Niederschlag ausfielen, waren die durch die betreffenden Salzlösungen gefällten Bakterien wieder ziemlich gut suspendierbar. 0,5 ccm der Suspension wurden Kaninchen subkutan injiziert, und die Injektionen in Intervallen von 6 Tagen fünfmal wiederholt. Die Tiere vertrugen die Injektionen ziemlich gut.

Jedes der so gewonnenen Sera wurde nun mit der zur Injektion benutzten Bakteriensuspension in bezug auf Agglutination ausgewertet und auch mit den verschiedenen vorbehandelten Typhusbacillen auf seine Reaktionsbreite geprüft.

Je 0,5 ccm steigender Serumverdünnungen wurden mit 0,5 ccm der Bakteriensuspensionen versetzt, und die Proben mehrere Stunden im Brutschrank gelassen. Die Agglutination wurde makroskopisch beobachtet; als „komplett“ wurden die Proben bezeichnet, in denen sich der Niederschlag gut ab-

gesetzt hatte, und die darüber stehende Flüssigkeit vollkommen klar war; „fast komplett“, wenn grobe Flocken in einer klaren Flüssigkeit suspendiert waren; „inkomplett“, wenn in der trüben Flüssigkeit spärliche Flocken sich zeigten, und als „Spur“, wenn das Auftreten von feinsten Körnchen, im durchfallenden Licht betrachtet, das Zustandekommen einer Reaktion eben noch erkennen ließ.

Kontrollbeobachtungen unter dem Mikroskop zeigten, daß es sich in allen Fällen um echte Agglutination handelte. Im allgemeinen war die Flockenbildung ganz analog der bei nativen Bakterien; Hemmungserscheinungen wurden bei höheren Konzentrationen einige Male beobachtet. Die verschieden vorbehandelten Bakterien zeigten in der Art der Agglutination keine Unterschiede. Als Kontrolle dienten Röhrchen, die mit 0,5 ccm Kochsalzlösung und 0,5 ccm der Bakteriensuspensionen beschickt waren; sie zeigten nie eine Ausflockung und sind deshalb in den folgenden Tabellen nicht eingezeichnet.

Im folgenden sind die Versuchsergebnisse übersichtlich zusammengestellt. Dabei wurde als „Bleiserum“ der Kürze halber ein Serum bezeichnet, das durch Injektion von Bleibakterien, als „Sublimatserum“, das mit Sublimatbakterien gewonnen wurde u. s. w.

Tabelle I. Bleiserum.

Serum- verdünnung	Bleibakt.		Native Bakt.		Quecksilber- bakterien		Silberbakt.	
	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.
1:50	k	k	i	k	k	k	k	k
1:100	k	k	i	k	k	k	fk	k
1:200	k	k	i	k	k	k	i	k
1:500	i	i	ø	i	i	i	ø	i
1:800	ø	i	ø	Sp	ø	i	ø	Sp
1:1000	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø

k = komplett, i = inkomplett, fk = fast komplett, Sp = Spur, ø = negativ.

Das Bleiserum zeigt für native Bakterien eine nur um wenig geringere Reaktionsfähigkeit als für die Metallbakterien; diese wurden alle in fast gleichem Ausmaße agglutiniert. Analoge Verhältnisse finden sich, wie eine spätere Tabelle zeigt, beim Serum des Pferdes Elsa, das mit erhitzten Bak-

terien hergestellt ist. Es hat demnach den Anschein, als wenn die Bildung eines Bleisalzes, ähnlich wie gelindes Erhitzen, für das Bakterienprotoplasma eine Veränderung von jener mittleren Intensität bedeuten würde, die eine möglichst große Reaktionsbreite erzeugt. Zu einer ganz gleichen Bewertung der Wirkung der Bleifällung gelangt auch Bechhold (13) auf Grund des Verhaltens der Bleibakterien gegenüber fällenden Salzen: in ihrer Fällbarkeit und der Hemmung derselben durch Gelatine unterscheiden sich die Bleibakterien kaum von nativen. Bechhold bezeichnet sie von diesem Gesichtspunkte aus als den Anfangspunkt einer Reihe, die von den nativen Bakterien zu den Agglutininbakterien führt.

Tabelle II. Sublimatserum.

Serumverdünnungen	Sublimatbakterien		Native Bakterien		Bleibakterien		Silberbakterien	
	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.
1:50	k	k	k	k	k	k	Sp	k
1:100	k	k	ik	k	k	k	Sp	k
1:200	k	k	Sp	k	k	k	Sp	ik
1:500	ik	k	Sp	k	ik	k	ø	Sp
1:1000	ik	fk	ø	ø	ø	ik	ø	ø
1:2000	ik	ik	.	.	ø	Sp	.	.
1:5000	ø	ø	.	.	ø	ø	.	.

Dieses Serum zeigt eine deutliche Spezifität auf Sublimatbakterien. Native Bakterien werden nur in höheren Konzentrationen gefällt; die Reaktion auf Silberbakterien ist auffallend schlecht.

Tabelle III. Eisenserum.

Serumverdünnungen	Bleibakterien		Native Bakterien		Sublimatbakterien		Silberbakterien	
	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.
1:20	k	k	ik	ik	ø	Sp	ø	ø
1:50	ik	k	ø	ik	ø	ø	ø	ø
1:100	Sp	ik	ø	ø	ø	ø	ø	ø
1:200	ø	ø	.	.	.	.	.	.

Die Bakterienfällung mit Eisenchlorid unterscheidet sich in auffallender Weise von der mit anderen Metallen. Die Bak-

terien werden als voluminöser, flockiger Niederschlag ausgefällt, und dieser ließ sich trotz sorgfältigen Waschens nicht mehr so vollkommen suspendieren, um für Agglutinationsversuche brauchbar zu sein, zumal die wieder suspendierten Eisenbakterien durch sehr geringe Kochsalzmengen ausgeflockt werden. Wie Tabelle III zeigt, schädigt die Fällung mit Eisenchlorid die agglutinogene Fähigkeit der Bakterien sehr bedeutend.

Verschiedene Eigentümlichkeiten der Fällung mit Eisenchlorid glaubt Bechhold durch die Annahme zu erklären, daß kolloidales Eisenhydroxyd Hüllen um die Bakterien bilde. Mit dieser Tatsache könnte auch das immunisatorische Verhalten der Eisenbakterien zusammenhängen, wofür die Beobachtungen von Defalle (14) an Hefen und Sporen eine Analogie bilden würden: dieser fand nämlich, daß erst, wenn durch Erhitzen oder Autolyse die sehr widerstandsfähige Hülle der Hefe oder der Sporen erweicht und für die Körpersubstanz hierdurch durchlässiger geworden ist, es gelingt, mit diesen Zellen ein mehr minder wirksames Serum zu erzeugen.

Tabelle IV. Silberserum.

Serumver- dünnung	Silber- bakterien		Native Bakterien		Sublimat- bakterien		Blei- bakterien	
	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.	nach $\frac{1}{2}$ Std.	nach 2 Std.
1:50	ik	k	ik	k	k	k	k	k
1:100	Sp	k	Sp	fk	Sp	k	fk	k
1:200	ø	Sp	ø	Sp	ø	Sp	Sp	ik
1:500	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø

Abgesehen von seinem relativ niedrigen Titer, zeigt dieses Serum keine besondere Eigentümlichkeit.

Diese beiden Pferdesera wurden noch vergleichsweise herangezogen. Das Pferd Edgar ist mit nativen Typhusbacillen immunisiert; sein Serum agglutiniert native Bakterien in bedeutend höheren Verdünnungen als die Metallbakterien. Das Elsaserum ist durch Injektion von 60—80° erhitzten Typhusbacillen hergestellt. Das Serum agglutiniert native und Metallbakterien fast in den gleichen Konzentrationen. Wie Joos für die Bakterienagglutination und Obermayer

Tabelle V.

Serum- Ver- dünnung	Edgar-Serum								Elsa-Serum							
	Native Bakterien		Silber- bakt.		Subl.- bakt.		Blei- bakt.		Nat. Bakt.		Silber- bakt.		Subl.- bakt.		Blei- bakt.	
	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.	n. 1/2 St.	n. 2 St.
1:1000	k	k	ik	k	ik	k	k	k	k	k	fk	k	k	k	k	k
1:5000	k	k	ø	ik	ø	ik	k	k	k	k	ik	k	fk	k	k	k
1:10 000	k	k	ø	ø	ø	ø	ø	ik	ik	k	Sp	ik	ik	fk	ik	k
1:15 000	ik	fk	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ik	ik	ø	ø	Sp	ik	ik	ik
1:20 000	ik	ik	ø	ø	ø	ø	ø	ø	Sp	Sp	ø	ø	ø	Sp	Sp	Sp
1:25 000	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø

und Pick für die Präzipitation gezeigt haben, verleiht die Immunisation mit erhitzten Antigenen dem Serum eine erheblich größere Reaktionsbreite als die mit nativen. Dieses Verhalten kommt für das Elsaserum in obiger Versuchsanordnung sehr schön zum Ausdruck.

Ein Ueberblick über die bisherigen Ergebnisse zeigt nun, daß die in der Einleitung ausgesprochenen Erwartungen durch das Experiment bestätigt wurden: es zeigten sich Unterschiede in der antigenen Fähigkeit der Metallbakterien und der nativen Bakterien einerseits und der einzelnen Metallbakterien untereinander.

Man könnte aber vielleicht noch einwenden, daß die beobachteten Differenzen durch eine verschieden große Stabilität der Metallbakterien-Suspensionen vorgetäuscht werden, ihre Ursache also mehr in Eigenschaften der Bakterien als der Sera hätten. Dem widersprechen aber mehrere Tatsachen: erstens geht Ausflockbarkeit und antigene Fähigkeit bei den einzelnen Bakterien meist parallel, dann werden die Metallbakterien durch die Metallsera besser, vom Edgarserum aber viel schlechter agglutiniert als die nativen, während Differenzen, die in einer Veränderung der Stabilität der Suspensionen ihre Ursache hätten, doch immer einsinnig sein müßten; endlich besitzt das Sublimatserum eine ausgesprochen spezifische Wirkung auf die zur Immunisierung verwendete Bakterienfällung.

Wir können also die Ergebnisse dahin zusammenfassen, daß der Eintritt eines Schwermetall-Ions in das

Bakterienprotoplasma eine Strukturveränderung desselben bewirkt, die unter anderem bis zu einem gewissen Grade auch in der Spezifität des immunisatorisch erzeugten Reaktionsproduktes zum Ausdruck kommt.

### III.

Da die Frage, ob agglutinierte Bakterien antigen wirken können, noch immer nicht eindeutig entschieden ist und sie prinzipiell unter die eingangs erörterten Gesichtspunkte fällt, unterzog ich sie nochmals einer experimentellen Prüfung.

Die Agglutination kann als Fällung eines Kolloids durch ein zweites Kolloid unter Bildung eines neuen Molekülkomplexes aufgefaßt werden. Dieses Reaktionsprodukt unterscheidet sich in vielen Punkten von den Ausgangssubstanzen. Besonders charakteristisch ist der Unterschied wieder suspendierter Agglutininbakterien gegenüber nativen bei der Ausflockung durch Salze. Nach Neisser und Friedemann (17) findet eine Herabsetzung des Schwellenwertes für die Fällung mit Schwermetallen in mäßigen Grenzen, in ganz besonderem Maße aber für Salze mit hoher Entladungsspannung statt.

Während Rehns sowie Nicolle und Trenell (18) mit agglutinierten Bakterien relativ hohe Agglutinationswerte erzielen konnten, sprechen Neisser und Lubowski (19) ihnen auf Grund ausgedehnter Versuche jede agglutinogene Fähigkeit ab. Sie kommen zu dem Schlusse, daß zwischen der Injektion von Agglutininbakterien und nativen Bakterien ein prinzipieller Unterschied besteht: Auf Injektion von Agglutininbakterien erfolgt meist gar keine Reaktion, manchmal eine geringe, selten eine wesentliche Steigerung des Agglutininwertes. Die spärlichen positiv reagierenden Fälle erklären sie mit nachträglicher Dissoziation der Bakterien-Agglutininverbindung im Tierkörper. Den Grund der gegenteiligen Resultate der französischen Autoren erblicken sie in dem Umstand, daß die von diesen verwendeten Bakterien nicht genügend mit Agglutinin abgesättigt waren, und daß die nicht agglutiniert zurückgebliebenen Bakterien immunisierend gewirkt haben. Derselbe Einwand bleibt aber auch diesen Autoren von seiten Eisenbergs und Volks (20) nicht erspart.

Wenn es auch richtig ist, daß die Anwesenheit von freiem Agglutinin in der darüberstehenden Flüssigkeit keineswegs als Beweis einer vollständigen Absättigung der Bakterien mit Agglutinin anzusehen ist, und bei der kolloidalen Natur der in die Reaktion eintretenden Körper ist ein solcher Endzustand auch kaum zu erwarten, so ergaben doch unsere Versuche, daß im gegebenen Falle ein Gleichgewichtszustand sich eingestellt hatte, indem die agglutinierten Bakterien in charakteristischer Weise von nativen unterschieden waren.

Nach den Angaben von Neisser und Lubowski wurden zwei 20-stündige Typhusagarkulturen in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, eine Stunde auf 60° erhitzt und mit einem reichlichen Ueberschuß von Agglutinin 3 Tage stehen gelassen. Hierauf wurden sie abzentrifugiert, neuerlich in Kochsalz aufgenommen und mit Agglutinin übersättigt. Nach weiteren 3 Tagen wurden 2 Kaninchen mit je zwei derart vorbehandelten Kulturen injiziert. Außerdem wurden nicht erhitzte Typhusbacillen derselben Prozedur unterworfen und 3 Kaninchen mit je 0,1 ccm derartig hergestellter Bakterien-suspension subkutan injiziert; zur Agglutination wurde ein ziemlich hochwertiges Serum eines mit erhitzten Typhusbacillen vorbehandelten Kaninchens benutzt.

Im Sinne der Fragestellung wurden nun die Sera zunächst auf Agglutininbakterien geprüft. Dabei ergaben sich aber dieselben technischen Schwierigkeiten, wie bei den Eisenbakterien: die Bakterien lassen sich nur schwer wieder suspendieren und sind gegen Kochsalz sehr empfindlich. Diese Schwierigkeiten ließen sich aber umgehen, indem die Bakterien sorgfältig gewaschen und die Serumverdünnungen in destilliertem Wasser hergestellt wurden. Die Kontrolle, die diesmal mit normalem Kaninchenserum gemacht wurde, zeigte, daß der Salzgehalt des Serums in Verdünnungen 1:50 noch nicht genügt, um die Bakterien auszuflocken.

In zwei wesentlichen Punkten unterscheiden sich nun die Resultate, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind, von denen Neissers und Lubowskis: 1) darin, daß schon nach der ersten Injektion die Sera einen gewissen Agglutinationswert zeigten, der 2) im Laufe der Immunisierung noch eine beträchtliche Steigerung erfuhr. Der erste Unterschied er-



Tabelle VI. Auswertung der Agglutininsera.

Serumverdünnungen	Kan. No. 95 mit agglut., vorher nicht erhitzten Bakt. injiziert						Kan. No. 25 wie das vorige		Kan. No. 24 mit agglut., vorher er- hitzten Bakt. injiziert		Kan. No. 23 wie das vorige		Kan. No. 22 wie No. 95	
	Nach der 1. Inj.		Nach der 2. Inj.		Nach der 3. Injektion		Nach der 1. Inj.		Nach der 1. Inj.		Nach der 1. Inj.		Nach der 1. Inj.	
	Aggl.-B.	Native B.	Aggl.-B.	Native B.	Blei.-B.	Subl.-B.	Aggl.-B.	Native B.	Aggl.-B.	Native B.	Aggl.-B.	Native B.	Aggl.-B.	Native B.
1:20	k	o	k	.	.	.	k	o	k	o	k	Sp	k	o
1:50	k	o	k	.	k	k	.	o	k	o	.	o	.	o
1:70	ik	o	.	.	k	k	.	o	ik	o	.	o	.	o
1:100	o	o	ik	k	k	fk	ik	.	o	o	.	o	ik	ik
1:200	.	.	o	k	Sp	o	o	.	ik	o	.	o	ik	o
1:500	.	.	.	o	o	o	o	.	.	.	.	o	o	.
1:1000	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	o	.	.

klärt sich durch die Prüfung der Sera auf Agglutininbakterien, während Neisser und Lubowski nur native Bakterien verwendet haben.

Es zeigt sich also hier deutlich die spezifische Wirkung auf die Agglutininbakterien, und hiermit dürfte wohl der Beweis erbracht sein, daß Agglutininbakterien die Fähigkeit besitzen, nochmals agglutinogen zu wirken. Durch die Spezifität der Reaktion erklärt sich das spätere Auftreten der Agglutinationsfähigkeit auf native Bakterien. Es hat dieses Verhalten wohl Analogien in dem Auftreten von Mitagglutininen bei länger fortgesetzter Immunisierung und der von Obermayer und Pick beobachteten Erscheinung, daß mit erhitztem Serumeiweiß erzeugte Sera zunächst nur dieses, später auch normales Serum präzipitieren.

Es erübrigt sich hiermit auch die Frage der mehr oder minder vollständigen Absättigung der Bakterien mit Agglutinin; denn es zeigen obige Resultate, daß bei entsprechendem Ueberschuß des Agglutinins und genügend langer Einwirkung desselben auf die Bakterien sich eine genügend stabile, zur Erzeugung eines selbständigen Immunkörpers befähigte Verbindung gebildet hatte.

Allerdings muß bei der Beurteilung dieser Ergebnisse noch ein Umstand in Betracht gezogen werden: die Agglutininbakterien befinden sich in ihren Suspensionen in einem sehr labilen Zustande, der sich außer in ihrer Fällbarkeit durch Leichtmetalle auch in ihrem Verhalten gegen Immunsera äußert. So zeigte sich, daß ein Kaninchenserum, welches nach einmaliger Injektion von auf 60° erhitzten Bakterien gewonnen war, native Bakterien in Verdünnungen von 1:20 komplett, 1:30 inkomplett agglutinierte, während Agglutininbakterien noch in einer Verdünnung von 1:40 komplett und 1:50 spurenweise ausgeflockt wurden, also Werte, welche bezüglich der Agglutininbakterien auch nach einmaliger Injektion von Agglutininbakterien (s. Tabelle VI) erreicht wurden. Ebenso flockten die verschiedenen anderen daraufhin untersuchten Sera die Agglutininbakterien in höheren Verdünnungen aus, als native oder Metallbakterien. Silberserum reagiert auf Agglutininbakterien in Verdünnungen von 1:200 komplett, 1:300 spurenweise, während es Silberbakterien in einer Verdünnung von 1:200 nur mehr schlecht agglutiniert. Sublimatserum agglutiniert Agglutininbakterien in einer Verdünnung von 1:1000 komplett; Edgarserum 1:20 000 komplett. Verfolgt man aber den Verlauf der Immunisierung mit Agglutininbakterien, so zeigt sich, daß diese Differenz in der Ausflockung zwischen Agglutininbakterien und nativen Bakterien immer kleiner wird: So agglutiniert Serum No. 95 nach der 1. Injektion Agglutininbakterien und normale im Verhältnis von 70:0, nach der 3. Injektion wie 200:100; Serum No. 24 nach der 1. Injektion wie 70:0, nach der 5. Injektion wie 500:200.

Gerade dieses Zusammenrücken scheint auf den spezifischen Charakter der Reaktion als Ursache dieses Verhaltens hinzuweisen, wenn sich auch aus den angeführten Versuchen ergibt, daß eine tiefer greifende Veränderung des Agglutinogens durch die als Kolloidfällung aufzufassende Agglutination nicht erfolgt. Aehnlich verhält es sich, wie der folgende Abschnitt zeigt, mit anderen Kolloidfällungen.

#### IV.

Zum Vergleiche mit der spezifischen Fällung der Bakterien durch ihr Immunagglutinin untersuchte ich noch die Wirkung

der Fällung durch ein nicht spezifisches Kolloid, und zwar durch Vesuvín, als Vertreter einer Gruppe von Farbstoffen, die Bakterien besonders gut agglutinieren.

Vesuvín fällt Typhusbacillen schon in großer Verdünnung seiner Lösung aus und bei der Wahl einer geeigneten Konzentration lassen sich die Vesuvínbakterien wieder gut suspendieren. Analog den früheren Versuchen, wurden Kaninchen in 6-tägigen Intervallen mit 0,1 ccm einer Aufschwemmung von Vesuvínbakterien, hergestellt aus zwei 24-stündigen Agarkulturaufschwemmungen in 5 ccm Kochsalzlösung, injiziert.

Tabelle VII. Vesuvínserum.

	Nach d. 1. Injektion				Nach der 5. Injektion											
	Vesuvín-bakt.		Native Bakt.		Vesuvín-bakt.		Native Bakt.		Subl.-bakt.		Blei-bakt.		Silber-bakt.			
	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.	nach 10 Min.	nach 2 Std.
1:20	k	k	Sp	k	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1:40	fk	k	Sp	k	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1:80	ø	fk	ø	ik	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1:100	ø	ik	ø	ø	fk	k	fk	k	ik	k	fk	k	ik	k	ik	k
1:200	ø	ø	.	.	fk	k	ik	k	Sp	k	ik	k	Sp	k	ik	k
1:500	.	.	.	.	fk	k	ik	k	ø	ø	Sp	ik	ø	ø	i	.
1:600	.	.	.	.	fk	k	Sp	ik	ø	ø	Sp	ik	ø	ø	ø	.
1:700	.	.	.	.	Sp	k	Sp	Sp	ø	ø	ø	Sp	ø	ø	ø	.
1:800	.	.	.	.	Sp	k	ø	Sp	ø	ø	ø	Sp	ø	ø	ø	.
1:1000	.	.	.	.	ø	Sp	ø	ø			ø	ø				.

Im Gegensatz zu dem Agglutininserum zeigt dieses Serum schon nach der 1. Injektion ein ziemliches Fällungsvermögen, das im Laufe der Immunisierung sich beträchtlich steigert. Es stimmt aber mit ihm überein in seiner andeutungsweise spezifischen Wirkung auf homologe Bakterien; auf native Bakterien reagiert es erst in etwas höheren Konzentrationen, noch schlechter auf Metallbakterien.

### Zusammenfassung.

I. Der Eintritt eines Metallions in das Bakterienprotoplasma bewirkt eine Strukturveränderung desselben, die bis zu einem gewissen Grade in der Spezifität des immunisatorisch erzeugten Reaktionsproduktes zum Ausdruck kommt.

II. Der Grad der Fähigkeit eines Metallbakteriums antigen zu wirken und die Reaktionsbreite des Serum geht in gewissen

Grenzen parallel seiner Agglutinierbarkeit durch Sera aus verschieden vorbehandelten Bakterien derselben Art.

III. Agglutininbakterien können antigen wirken und erzeugen ein Serum, das auf diese in einer bestimmten Breite spezifisch, in geringerem Ausmaße aber auch auf anders vorbehandelte Bakterien derselben Art reagiert.

IV. Mit Vesuvin gefällte Bakterien erzeugen ein Serum, das in seinen Eigenschaften dem Agglutininserum ziemlich nahesteht.

V. Die Kolloidfällungen, wie z. B. die Immunserumagglutination und die Vesuvinagglutination, bewirken keine tiefer greifenden Veränderungen des Agglutinogens.

Wien, Juli 1908.

#### Literatur.

- 1) Nicolle, Annal. Pasteur, 1898.
- 2) Winterberg, Zeitschr. f. Hyg., 1899.
- 3) Pick, Beiträge zur chem. Phys. u. Pathol., 1901.
- 4) Rodet et Lagrifoul, Soc. de Biol., 1903.
- 5) Brieger u. Meyer, Deutsche med. Wochenschr., 1903.
- 6) Carega, Centralbl. f. Bakt., Bd. 34, No. 4.
- 7) Joos, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33.
- 8) Kraus u. Joachim, Centralbl. f. Bakt., Bd. 34 u. 37.
- 9) Passini, Münch. med. Wochenschr., 1904.
- 10) Porges, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39.
- 11) Obermayer u. Pick, Wiener klin. Wochenschr., 1902 und 1904.
- 12) Pauli, Beiträge zur chem. Phys. u. Pathol., Bd. 6, 1905.
- 13) Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 48.
- 14) Defalle, Annal. Pasteur, 1902.
- 15) Rehns, Soc. de Biol., 1900.
- 16) Neisser u. Friedemann, Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 19.
- 17) Nicolle et Trenelle, Annal. Pasteur, 1902.
- 18) Neisser u. Lubowski, Centralbl. f. Bakt., 1901.
- 19) Eisenberg u. Volk, Zeitschr. f. Hyg., 1902.
- 20) Paltauf, Handbuch der path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann.
- 21) Glässner, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie, Bd. 1, Heft 3.
- 22) Paltauf, Deutsche med. Wochenschr., 1903, No. 50.

[Aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte und aus der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Charlottenburg-Westend; dirigierender Arzt: Prof. Dr. Grawitz.]

**Beitrag zur Frage der komplementablenkenden Wirkung der Sera von Scharlachkranken <sup>1)</sup>.**

Von

Stabsarzt Dr. **Haendel**,  
komm. zum Kaiserl. Gesund-  
heitsamt.

und

Dr. **Werner Schultz**,  
Oberarzt am Städt. Krankenhaus  
Charlottenburg-Westend.

**I. Komplementablenkung durch Sera Scharlachkranker mit luetischen Extrakten.**

Auch heute ist noch keine vollkommen einheitliche Auffassung über die theoretischen Grundlagen der Wassermannschen Luesreaktion erreicht, so sehr sich auch im Laufe der Zeit die Anschauungen über das Wesen derselben geändert haben. Während Wassermann und seine Mitarbeiter entsprechend ihren Untersuchungen mit gelösten Bakterienextrakten und den zugehörigen Antiseris, ursprünglich von dem Gesichtspunkte ausgingen, auch bei Lues eine Einwirkung von Antikörper und Antigen durch Komplementbindung nachzuweisen, wurde von Weygandt (1), Marie und Levaditi (2), Landsteiner, Müller und Poetzl (3), Kraus und Volk (4), Weil (5), Weil und Braun (6), Michaelis (7) u. a. festgestellt, daß Luessera auch mit nicht-luetischen bzw. mit normalen Organextrakten Komplementbindung bewirken können.

Die Ansicht dieser Autoren, daß sonach das Phänomen nicht auf einer Antikörper-Antigenreaktion im eigentlichen Sinne beruhe, fand eine Stütze in den Ergebnissen der Arbeiten von Wassermann, Porges und Meier (8), von Landsteiner, Müller und Poetzl (9) sowie von Levaditi und Yamanouchi (10), durch welche übereinstimmend nachgewiesen wurde, daß der wirksame Stoff aus den Organen

---

1) Ueber die ersten von uns beobachteten Fälle, in welchen wir Scharlachsera eine positive Wassermannsche Reaktion geben sahen, ist von uns bereits auf der Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie im Juni dieses Jahres berichtet worden.

durch Alkohol extrahiert werden konnte, und sonach nicht eiweißartige, sondern lipoid Substanzen als wirksames Prinzip in Frage kommen sollten.

Meier und Porges erhielten denn auch mit reinem Lecithin dieselbe Reaktion wie mit wässrigem Organextrakt, während Levaditi und Yamanouchi, Sachs und Altmann (11), Fleischmann (12) weiterhin zeigten, daß unter Umständen auch glykocholsaures Natron, ölsaures Natron, Cholesterin, selbst Vaseline an Stelle des Antigens treten können.

Auf Grund dieser Auffassung, daß bei dem Komplementbindungsphänomen eine Antigen-Antikörperreaktion im eigentlichen Sinne nicht vorliegt, ist nun von einigen Seiten die Spezifität der Reaktion bestritten worden. Gegenüber den oben erwähnten Befunden könnte wohl in der Tat eine Spezifität der Reaktion auch nur insofern noch in Frage kommen, wenn man annimmt, daß es sich bei der Komplementbindung mit wässrigen und alkoholischenluetischen Organextrakten und bei der mit normalen Extrakten oder mit Lecithin- oder Seifenlösungen um verschiedene Reaktionen handelt. Wir glauben, daß eine derartige Annahme keineswegs ohne weiteres von der Hand gewiesen werden kann, und werden später noch auf diese Frage zurückkommen. Wassermann (13) neigt auch heute noch einer entsprechenden Auffassung zu. Er ist der Ansicht, daß es sich bei dem Antigen um eine Verbindung von Lipoiden mit ganz geringen Mengen den Eiweißkörpern nahestehender Substanzen handelt, und will es deshalb vorläufig noch unentschieden lassen, ob das Verhalten nicht etwa so ist, daß in einem Extrakt aus syphilitischen Organen neben den nicht spezifischen Lipoiden, wenn auch ganz geringe Mengen spezifischer, nur demluetischen Organismus eigener Substanzen enthalten sind, die für die absolute Zuverlässigkeit der Reaktion doch eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Unabhängig davon, ob es sich bei der Komplementbindung durchluetische Sera um eine im Sinne der Immunitätslehre spezifische Reaktion handelt, ist die Frage bezüglich der klinischen Spezifität der Wassermannschen Reaktion. Auch diese Frage ist von verschiedenen Seiten in verneinendem Sinne beantwortet worden. In der Literatur finden sich eine

Reihe von Angaben, daß auch nicht-luetische Sera eine positive Reaktion, wenn auch zum Teil etwas schwächer, gegeben haben. Zu erwähnen sind hier die Befunde von Michaelis (7) bei je einem Fall von Typhus, Schrumpfniere und Phthise, von Hoffmann und Blumenthal (14) bei Psoriasis und Frambösie, von Landsteiner, Müller und Poetzl (15), Hartoch und Jakimoff (16), Manteufel und Woithe (17) im Tierversuch (Dourine, Nagana), von Elias, Neubauer, Porges und Salomon (18) bei Phthise und Diabetes, Weil und Braun (19) bei verschiedenen Infektionskrankheiten, von Wechselmann und Meier (20) und Eitner (21) bei Lepra.

Immerhin handelt es sich jedoch bei diesen Mitteilungen immer nur entweder um ganz vereinzelte Fälle oder um Erkrankungen, die wegen ihres seltenen Vorkommens bei uns, nach ihrem ganzen Verlauf oder aus anderen Gründen differentialdiagnostisch in praktischer Hinsicht nicht weiter in Betracht kommen, so daß dadurch die klinische Brauchbarkeit der Reaktion, wie auch die meisten der betreffenden Autoren selbst zugeben, nicht beeinträchtigt wird. Ein besonderes Interesse kommt nun aber bezüglich der Frage der klinischen Spezifität der Wassermannschen Luesreaktion der in jüngster Zeit von Much und Eichelberg (22) gemachten Angabe zu, daß sie bei einer bei uns recht häufigen Krankheit, dem Scharlach, in 40—45 Proz. der untersuchten Fälle eine positive Reaktion erhalten haben. Die Mitteilungen Muchs und Eichelbergs sind schon verschiedentlich, so von Bruck (23), Jochmann und Toepfer (24), Boas und Hauge (25), Höhne (26), G. Meier (27) und Schleißner (29) nachgeprüft worden, haben aber von keiner Seite bisher eine Bestätigung erfahren. Much und Eichelberg, Jochmann und Töpfer sowie Meier haben mit wässerigen luetischen Extrakten, Höhne mit alkoholischem luetischen Extrakt, Boas und Hauge und Schleißner mit alkoholischem Normalextrakt gearbeitet.

Auf Veranlassung von Herrn Geheimrat Professor Dr. Uhlenhuth haben wir schon seit längerer Zeit bei verschiedenen Infektionskrankheiten ausgedehntere Untersuchungen hinsichtlich des Komplementablenkungsphänomens vorgenom-

men, die sich auch auf eine größere Reihe von Sera Scharlachkranker erstreckten.

Ueber die bei den Untersuchungen der Scharlachsera enthaltenen Befunde möchten wir nachstehend kurz berichten, weil sie uns auf eine Erscheinung aufmerksam machten, die trotz ihrer Bedeutung in der einschlägigen Literatur unseres Wissens noch nicht hervorgehoben wurde und die geeignet erscheint, eine Erklärung für die so divergierenden Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen von Scharlachseris zu geben. Wir machten nämlich die Beobachtung, daß bei Benutzung verschiedener, ganz in gleicher Weise nach den Wassermannschen Vorschriften hergestellter wässriger Extrakte ausluetischen Fötallebern die Untersuchungsergebnisse bei einer längeren Untersuchungsreihe zwar völlig übereinstimmen können, daß dann aber doch mitunter einmal bei Prüfung eines Serums mit dem einen Extrakt ein anderes Resultat erhalten wird als bei der Untersuchung desselben Serums mit dem anderen Extrakt. Wir wurden auf diese Erscheinung zuerst bei Untersuchung eines Scharlachserums aufmerksam, das bei Prüfung mit einem Extrakt eine vollkommen positive Wassermannsche Reaktion gab, während mit einem anderen Extrakt Hämolyse eintrat.

Dieselbe Beobachtung konnten wir ferner an zwei weiteren Scharlachseris und auch bei einemluetischen Serum machen, welches ebenfalls mit einem Extrakt völlige Komplementbindung bewirkte, mit einem zweiten Extrakt dagegen die Hämolyse nicht hemmte. Es scheint sonach, daß die Reaktionsbreite wässrigerluetischer Extrakte nicht immer absolut kongruent ist, sondern daß ein Extrakt mit einem bestimmtenluetischen Serum — allerdings wird es sich wohl immer nur um verhältnismäßig seltene Fälle handeln — noch eine positive Reaktion geben kann, demgegenüber ein anderer Extrakt versagt. Die größere Reaktionsbreite eines Extraktes kann sich offenbar aber auch unter besonderen Umständen anderen alsluetischen Seris gegenüber geltend machen. Ob ein derartiges Uebergreifen irgendeinem beliebigen Serum gegenüber einmal stattfinden kann oder ob es auf Sera bestimmter Krankheitsgruppen beschränkt bleibt, ist die Frage. Wir haben es bisher beiluetischem Extrakt nur Scharlachseris gegenüber beobachtet. Die



Tatsache, daß bei etwa 300 Untersuchungenluetischer und anderer Sera, der in Frage stehende Extrakt außer mit Scharlachseris nie mit einem anderen nicht-luetischen Serum Komplementbindung bewirkt hat, scheint darauf hinzuweisen, daß das letztere der Fall ist. Die klinische Brauchbarkeit der Wassermannschen Reaktion würde jedenfalls, wenn ein Uebergreifen eines derartigen Extraktes nur mit Scharlachseris, nicht aber mit irgendeinem beliebigen Serum zustande kommen kann, nicht weiter beeinträchtigt werden, da nach den bisherigen Erfahrungen, nach den Untersuchungen von Much und Eichelberg und nach unseren anzunehmen ist, daß eine positive Reaktion bei Scharlachseris im allgemeinen nicht lange bestehen bleibt.

Diese verschiedenartige Wertigkeit der Extrakte hinsichtlich ihrer Reaktionsbreite spielt aller Wahrscheinlichkeit nach neben der verschiedenen Technik auch mit eine gewisse Rolle dabei, daß nach den Angaben in der Literatur die einzelnen Untersucher bei Prüfungluetischer Sera zum Teil doch recht abweichende Prozentzahlen erhalten haben, sie erklärt unseres Erachtens aber ferner auch auf einfache Weise den auffallenden Widerspruch zwischen den positiven Untersuchungsergebnissen bei Scharlach von Much und Eichelberg, und den negativen der anderen Autoren.

Seligmann und Klopstock teilen in einer in No. 38 der Berliner klinischen Wochenschrift erschienenen Arbeit die Beobachtung mit, daß der von ihnen als Antigen benutzte alkoholische Extrakt aus normalen Menschenherzen plötzlich mit allen untersuchten Scharlachseris aber auch mit Normalseris Komplementbindung bewirkte, was vorher nicht der Fall war. Die Autoren nehmen an, daß sich ihr Extrakt plötzlich verändert hatte, und daß solche Veränderungen vielleicht auch bei den Befunden von Much und Eichelberg eine Rolle spielen.

Eine derartige Erklärung kommt für unsere Befunde natürlich nicht in Betracht. Der von uns benutzte wässerigeluetische Extrakt hat mit Normalseris nie Komplementbindung bewirkt. Ferner liegen unsere mit einzelnen Scharlachseris erhaltenen positiven Befunde zeitlich auseinander, während in den Zwischenzeiten jeweils eine Reihe von Scharlachseris mit demselben Extrakt negative Reaktion gab. Die positiv reagierenden Scharlachsera haben bis auf eines bei der zweiten Entnahme schon nach wenigen Tagen ebenfalls mit demselben Extrakt die Hämolyse nicht mehr gehemmt.

Wir selbst haben 48 Scharlachfälle untersucht, die in nachstehender Tabelle I zusammengestellt sind. Sämtliche

Fälle betrafen Kinder im Alter von 2—15 Jahren. Bei keinem der Kinder waren weder anamnestische noch objektive Anhaltspunkte für eine luetische Erkrankung bzw. hereditäre Belastung nachzuweisen. Zu den Untersuchungen haben wir 2 Extrakte verwandt, als Extrakt I und Extrakt II bezeichnet. Beide Extrakte waren nach der von Wassermann und Meier gegebenen Vorschrift aus Lebern luetischer Föten hergestellt. Die wirksame Dosis beider Extrakte war 0,2. Die Extrakte haben sich bei sehr großen Untersuchungsreihen luetischer und normaler Sera vollkommen bewährt. Als Gebrauchsdosis der Sera benutzten wir gleichmäßig je 0,2. Alle Sera wurden gleich nach der Entnahme  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 60° inaktiviert und am selben, spätestens am 2. Tage nach der Entnahme untersucht. Als hämolytisches System verwandten wir Hammelblutkörperchen (5-proz. Aufschwemmung) und Antihammelblut-Kaninchenserum (Titer etwa 0,0005). Die Blutkörperchen waren bei den Versuchen mit der 4—5-fachen Menge der komplett lösenden Ambozeptordosis sensibilisiert. Als Komplement diente jeweils 0,1 ccm frischen Meerschweinchen-serums.

Tabelle I.

+ bedeutet komplette Lysis, 0 = komplette Hemmung, — bedeutet nicht untersucht.

No.	Alter des Patienten Jahr	Krankheitstag, an welchem die Serumentnahme stattgefunden	Extrakt I	Extrakt II	Normal- extrakt
1	.	.	+	—	—
2	.	.	+	—	—
3	.	.	+	—	—
4	$5\frac{3}{4}$	4	—	+	+
5	14	4	—	+	+
6	.	.	+	—	—
7	.	.	+	—	—
8	5	4	—	+	+
9	15	3	—	+	+
10	.	.	+	—	—
11	.	{ 3	0	—	—
12	.	{ 16	+	+	+
13	.	.	+	—	—
14	.	{ 4	0	—	—
15	13	{ 10	+	+	+
16	4	{ 3	—	+	+
		{ 2	—	+	+

No.	Alter des Patienten Jahr	Krankheitstag, an welchem die Serumentnahme stattgefunden	Extrakt I	Extrakt II	Normal- extrakt
17	4	33	—	+	+
18	5	4	—	+	+
19	.	.	+	—	—
20	.	23	—	+	+
21	9	3	—	+	+
22	.	5	+	+	+
23	3 1/2	10	+	+	+
24	.	.	+	—	—
25	6	3	+	+	+
26	.	3	—	+	+
27	3	3	+	+	+
28	11	3	+	+	+
29	.	3	+	+	+
30	.	4	+	+	+
31	.	.	+	—	—
32	.	{ 3	0	—	—
33	.	{ 17	+	+	+
34	.	{ 3	+	+	+
35	9	{ 4	0	+	+
36	9	{ 9	+	+	+
37	9	{ 3	+	+	+
		{ 13	+	+	+
		{ 3	—	+	+
		{ 2	0	0	+
		{ 12	0	0	+
38	6	{ 23	0	0	+
		{ 30	0	0	+
		{ 47	0	0	+
		{ 72	0	0	+
39	.	4	+	+	+
40	2	3	+	+	+
41	7	2	—	+	+
42	.	.	+	—	—
43	7	2	+	+	+
44	5	7	0	+	+
45	9	4	+	+	+
46	8	5	+	+	+
47	5	3	0	+	+
48	11	4	+	+	+

Auf Grund unserer Untersuchungen können wir, wie aus der Zusammenstellung ersichtlich ist, die Angaben von Much und Eichelberg insofern bestätigen, als auch wir sahen, daß einzelne Scharlachsera mit einemluetischen Extrakt vollständige Komplementablenkung bewirken können. Es handelt sich um die Sera No. 11, 14, 32, 34, 38, 44 und 47 der Tabelle. Mit einer Ausnahme haben aber die Sera nur mit dem einen bei den Untersuchungen benutzten Extrakte einen

positiven Ausschlag gegeben. Drei der Sera, No. 11, 14, 32, waren ursprünglich nur mit Extrakt I untersucht. Bei der Prüfung einer späteren Serumentnahme mit beiden Extrakten fiel die Reaktion dann bei allen drei Fällen negativ aus. Die Sera No. 34, 44, 47 waren gleich mit beiden Extrakten geprüft worden und hatten mit Extrakt I eine positive, mit Extrakt II negative Reaktion gegeben. Bei Serum No. 34 war bei der zweiten Entnahme die Reaktion mit beiden Extrakten ebenfalls wieder negativ. Die Sera No. 44 und 47 sind noch nicht wieder untersucht.

Nur das Serum eines scharlachkranken Kindes, No. 38 der Tabelle, bewirkte schon bei der ersten Untersuchung mit beiden Extrakten völlige Hemmung der Hämolyse. Dieser Fall unterscheidet sich von den übrigen auch insofern, als bei ihm die Reaktion bisher über 10 Wochen positiv geblieben ist, während sie in den übrigen Fällen bei der zweiten Serumentnahme schon nach wenigen Tagen auch bei Prüfung mit Extrakt I negativ ausfiel. Es handelt sich um ein elternloses Kind im Alter von 6 Jahren, bei dem leider keine sichere Anamnese zu erheben ist, so daß gerade in diesem Falle bei dem Fortbestehen der Reaktion die Möglichkeit einer hereditären Lues nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, wenn auch keinerlei objektive Anhaltspunkte für eine derartige Annahme vorliegen. Vielleicht spielt bei dem längeren Fortbestehen der Reaktion in diesem Falle auch der Umstand eine Rolle, daß das Kind außerdem inzwischen an Varizellen erkrankt ist. Sonst wäre im allgemeinen nur noch zu erwähnen, daß bei allen übrigen Fällen mit positiver Reaktion dieselbe schon früh, am 2.—5. Tage, aufgetreten und bei den nachuntersuchten Fällen bei der zweiten Entnahme bei No. 34 am 9., bei No. 11 am 16., bei No. 32 am 17. und bei No. 14 am 10. Tage wieder verschwunden war.

## **II. Komplementablenkung durch Sera Scharlachkranker mit einem Extrakt aus der Leber eines scharlachkranken Kindes.**

Dank dem liebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Professor Dr. Brandenburg waren wir im Laufe der Untersuchungen auch in der Lage, einen Teil der Scharlachsera mit einem Extrakt prüfen zu können, welchen Professor

Brandenburg aus der Leber eines Kindes, das an einem als Komplikation bei Scharlach aufgetretenen Empyem gestorben war, gewonnen hatte. Der Extrakt war in der Weise hergestellt, daß die zerkleinerte Leber mit 0,85-proz. Kochsalzlösung, welche  $\frac{1}{2}$  Proz. Karbol enthielt, im Verhältnis 1:5 während 6 Tagen ausgelaugt und dann abzentrifugiert worden war. Die wirksame Dosis dieses Extraktes war 0,25. Als Prüfungsdosis der Sera benutzten wir 0,2 ccm. Das hämolytische System war das gleiche, welches wir auch bei den anderen Untersuchungen angewandt hatten. Als Komplement diente ebenfalls je 0,1 ccm Meerschweinchenserum.

Tabelle II enthält eine vergleichende Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse der mit diesem und luetischem Extrakt untersuchten Scharlachsera.

Tabelle II.

No.	Alter des Kindes	Krankheitstag, an dem die Entnahme erfolgte	Luetischer Extrakt	Scharlach-Extrakt
1	.	2	+	0
2	.	3	+	+
3	2	3	+	0
4	9	3	+	0
5	11	3	+	0
6	8	3	+	0
7	6	3	+	0
8	.	3	+	0
9	9	3	+	0
10	7 $\frac{1}{2}$	10	+	0
11	9	13	+	0
12	9	3	+	+
13	.	23	+	0
14	7	2	+	0
15	.	4	+	+
16	.	4	+	0
17	11	4	+	+
18	8	5	+	0
19	.	4	0	+
20	.	5	+	0
21	.	3	0	0
22	.	23	0	0
23	.	3	+	0
24	7	1	+	0
25	9	4	+	0
26	.	.	+	+
27	.	.	+	+
28	.	.	+	0
29	.	.	+	0
30	.	.	+	0
31	.	.	+	0

7\*

Wie aus der Zusammenstellung ersichtlich, ergab sich sonach, daß von den 31 untersuchten Scharlachseris mit diesem Extrakt 24 vollkommene Komplementbindung bewirkten, während nur 7 Sera keinen hemmenden Einfluß auf die Hämolyse ausübten, darunter ein Serum No. 19 der Tabelle, welches mit demluetischen Extrakt I eine positive Reaktion ergeben hatte. Auch hier war bei den nachuntersuchten Fällen bei der zweiten Entnahme die positive Reaktion schon nach wenigen Tagen wieder geschwunden.

Die Wirksamkeit dieses Extraktes war nicht ausschließlich auf Scharlachsera beschränkt, sondern wir sahen auch zwei Masernsera, ein Keuchhustenserum, das Serum eines Nephritikers und die überwiegende Mehrzahl der zahlreichen daraufhin untersuchten Luesseris mit dem Extrakt die Hämolyse hemmen. Daß der Extrakt mit einer sehr großen Anzahlluetischer Sera Komplementbindung ergab, ist nicht weiter auffallend. Nach verschiedenen Angaben in der Literatur können Luesseris auch mit normalen Extrakten Komplementablenkung bewirken. Von vielen Untersuchern wird ja die Prüfung derluetischen Sera auf ihre ablenkende Wirkung nur mit normalen Extrakten vorgenommen. Es erscheint eher bemerkenswert, daß in diesem Falle ein nichtluetischer Extrakt zwar mit den meisten untersuchten Luesseris Komplementbindung bewirkte, einer Anzahl solcher Sera gegenüber aber versagte, während dieselben Sera aber mit einemluetischen Extrakt eine ausgesprochen positive Reaktion gaben.

Diese Beobachtung legt wohl die Annahme nahe, daß es nicht so ganz gleichgültig zu sein scheint, ob zur Anstellung der Reaktion ein aus normalen bzw. aus nichtluetischen oder ausluetischen Organen hergestellter Extrakt benutzt wird; sie spricht unseres Erachtens für die Ansicht Wassermanns, daß mit einem spezifischen Extrakt zuverlässigere Resultate erhalten werden und daß normale Extrakte nicht ohne weiteres solchen ausluetischen Organen gleichgesetzt werden können.

Erwägt man nun bei einer vergleichenden Betrachtung, daß bei Prüfung von Lues- und Scharlachseris mit einemluetischen Extrakt die ersteren so gut wie regelmäßig, die letzteren nur ganz vereinzelt ablenken, während bei der Unter-

suchung mit einem Scharlachextrakt das Resultat sich in der Weise verschiebt, daß die Mehrzahl der Scharlachsera nun positiv reagieren, während ein Teil der Luessera die Hämolyse nicht mehr hemmt, so drängt sich doch unwillkürlich der Gedanke auf, ob nicht tatsächlich entsprechend der Anschauung Wassermanns beim Zustandekommen der Reaktion neben nicht-spezifischen doch auch spezifische Vorgänge eine Rolle spielen, wenn sie auch nicht immer deutlich oder vorherrschend in Erscheinung treten. Bestimmte Schlüsse lassen sich aus den mitgeteilten Untersuchungsergebnissen hinsichtlich der komplementablenkenden Wirkung von Scharlachseris mit homologen Extrakten allerdings unseres Erachtens noch nicht ziehen, da einmal das vorliegende Material noch recht klein ist, dann aber auch deshalb nicht, weil uns nur ein Extrakt zur Verfügung stand, der außerdem nicht in der gewöhnlichen Weise bereitet war. Immerhin erscheint uns aber die Tatsache, daß wir von den 31 untersuchten Scharlachseris 24 mit dem homologen Extrakt die Hämolyse vollständig hemmen sahen, der Beachtung und weiteren Prüfung wert, namentlich unter Anwendung mehrerer verschieden lange extrahierter und möglichst aus verschiedenen Organen von Scharlachleichen gewonnener Extrakte. Uns selbst war es leider aus Mangel an Material bisher nicht möglich, weitere Untersuchungen in dieser Hinsicht auszuführen.

### Zusammenfassung.

I. Die Reaktionsbreite verschiedener wässriger, in gleicher Weise aus luetischen Fötallebern hergestellter Extrakte ist nicht absolut kongruent.

II. In seltenen Fällen kann es daher vorkommen, daß ein luetisches Serum mit einem luetischen Extrakt eine positive mit einem anderen dagegen eine negative Reaktion gibt.

III. Ebenso können einige Scharlachsera mit einem luetischen Extrakt eine positive Reaktion geben, während sie mit einem anderen luetischen Extrakt die Hämolyse nicht hemmen.

IV. Die ablenkende Wirkung von Scharlachseris mit luetischen Extrakten tritt schon in den ersten Krankheitstagen auf und verschwindet in der Regel schon nach wenigen Tagen wieder.

V. Die Wassermannsche Luesreaktion wird dadurch, daß einzelne Scharlachsera eventuell mit einemluetischen Extrakt Komplementbindung bewirken können, in ihrer klinischen Brauchbarkeit nicht beeinträchtigt.

VI. Mit einem aus der Leber eines an einer Scharlachkomplikation gestorbenen Kindes gewonnenen, wässerigen Extrakt haben von 31 untersuchten Scharlachseris 24 eine völlige Hemmung der Hämolyse bewirkt. Die ablenkende Wirkung war bei den nachuntersuchten Seris nach wenigen Tagen wieder geschwunden.

VII. Mit demselben Extrakt haben neben einzelnen anderen Seris von den darauf geprüften, mitluetischem Extrakt ablenkenden Luesseris viele, aber nicht alle, eine positive Reaktion gegeben.

#### Literatur.

- 1) Weygandt, Deutsche med. Wochenschr., 1907, S. 1239.
- 2) Marie u. Levaditi, Annal. de l'Institut Pasteur, T. 21, No. 2.
- 3) Landsteiner, Müller u. Poetzel, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 17.
- 4) Kraus u. Volk, ebenda.
- 5) Weil, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 18.
- 6) Weil u. Braun, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 49.
- 7) Michaelis, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 35.
- 8) Wassermann, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 50 und Porges u. Meier, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 15.
- 9) Landsteiner, Müller u. Poetzel, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 50.
- 10) Levaditi u. Yamanouchi, Compt. rend. Soc. Biol., 1907, No. 38.
- 11) Sachs u. Altmann, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 10.
- 12) Fleischmann, Wiener klin. Wochenschr., 1907.
- 13) Wassermann, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 21.
- 14) Hoffmann u. Blumenthal, Dermat. Zeitschr., 1908, No. 1.
- 15) Landsteiner, Müller u. Poetzel, Wiener klin. Wochenschr., 1908.
- 16) Hartoch u. Jakimoff, Wiener klin. Wochenschr., 1908.
- 17) Manteufel u. Woithe, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 29, Heft 2.
- 18) Elias, Neubauer, Porges u. Salomon, Wiener klin. Wochenschr., 1908.
- 19) Weil u. Braun, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 26.
- 20) Wechselmann u. Meier, Deutsche med. Wochenschr., 1908.
- 21) Eitner, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 20.
- 22) Much u. Eichelberg, Medizinische Klinik, 1908, No. 18, 28 u. 29.



- 23) Bruck, 10. Tagung der Deutschen Dermatol. Gesellschaft, Frankfurt 1908.  
24) Jochmann u. Toepfer, Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 32.  
25) Boas u. Hauge, Berl. klin. Wochenschr., 1908.  
26) Höhne, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 38.  
27) G. Meier, Medizinische Klinik, 1908, No. 36.  
28) Seligmann u. Klopstock, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 38.  
29) Schleißner, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 40.

**Nachtrag bei der Korrektur.**

In einer soeben in der Berl. klin. Wochenschr. vom 26. Okt. 1908, No. 43, erschienenen Arbeit machen Halberstädter, Müller und Reiche die Mitteilung, daß auch von verschiedenen alkoholischenluetischen Extrakten, der eine mit einzelnen Scharlachseris eine positive Reaktion geben kann, während andere Extrakte mit denselben Seris keine Komplementbindung bewirken. Diese Beobachtung entspricht unseren mit wässerigenluetischen Extrakten gemachten Erfahrungen.

---

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institut in Wien;  
Vorstand: Prof. R. Paltauf.]

**Ueber Beziehungen der Toxolabilität und Toxostabilität  
der Antitoxine zu deren Heilwerte.**

**Zweite Mitteilung über Avidität der Antitoxine.**

**Von Prof. R. Kraus und Dr. J. Schwoner.**

Pick und Schwoner haben die Diphtheriesera je nach ihrem Verhalten gegenüber Toxin bei partieller Absättigung in toxostabile und toxolabile Antitoxine eingeteilt. Toxostabil sind jene Sera, welche bei fraktioniertem Toxinzusatz keinen Verlust an Immunitätseinheiten aufweisen, toxolabil jene, bei welchen unter den gleichen Verhältnissen eine Anzahl Immunitätseinheiten verloren gehen. Bei diesen Versuchen erwiesen sich die hochwertigen Diphtheriesera als toxolabil, die minderwertigen als toxostabil. Wir haben nun in der ersten Mitteilung „Ueber die Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert“ den Satz aufgestellt, daß das hochwertige (400—600-fache) Diphtherieserum eine geringere Heilwirkung besitzt als das (70—150-fache) minder-

wertige. Es wäre nicht unwahrscheinlich, daß die Erscheinung der Toxolabilität und Toxostabilität der Antitoxine in jener von uns festgestellten Disproportionalität des Heilwertes zum Antitoxingehalt und auch in der Art der Neutralisation ihre letzte Ursache haben dürfte, und daß beide Erscheinungen schließlich auf dieselben Faktoren zurückgeführt werden könnten. Es war uns daher interessant zu erfahren, ob diese beiden Phänomene parallel verlaufen, oder ob sie als voneinander unabhängig bestehen.

Zu diesem Behufe haben wir mit verschiedenen Seris — hoch- und minderwertigen — einerseits Versuche nach Pick und Schwoner, andererseits kurative Versuche an Meerschweinchen angestellt. Die letzteren wurden in der Weise ausgeführt, daß Toxin und Serum getrennt subkutan, letzteres 1 Stunde nach der Vergiftung, injiziert wurden. Das hierbei angewandte Toxin war das gleiche, wie in den ersten Versuchen, 0,03 ccm töteten Meerschweinchen von 250 g in 3—4 Tagen, als Giftdosis verwendeten wir 0,1 ccm, d. i. die beiläufig 3-fache letale Dosis. Die Versuchstechnik zur Bestimmung der Toxolabilität resp. -stabilität war die von Pick und Schwoner angegebene, und die hierbei verwendeten Toxine hatten nach Ehrlich einen  $L_+$ -Wert von 0,7 resp. 0,75 ccm.

#### I. Versuch.

Von einem 100-, 150- und 600-fachen Serum werden einfach überkompensierte Gemenge dargestellt, wobei das Verhältnis von IE : TE 2 : 1 beträgt.

a) Serum Kondor 100-fach:

100 IE d. i. 1 ccm + 50 TE des Toxin  $H_v$  mit der  $L_+$  0,7 d. i. 35 ccm Toxin + 4 ccm NaCl.

b) Serum Laertes 150-fach:

300 IE d. i. 2 ccm + 150 TE vom Toxin  $H_v$  d. i. 105 ccm + 3 ccm NaCl.

c) Serum Loki 600-fach:

300 IE d. i. 0,5 ccm + 150 TE vom Toxin  $H_v$  d. i. 105 ccm + 1,5 ccm NaCl.

Das Resultat der Prüfung dieser Mischungen zeigt folgende Tabelle:

Tabelle I.

Nummer der Mischung	Menge der Mischung	Toxin	Meersch.-No.	Resultat
a	0,8	0,7 Hv	809	† nach 2 Tagen
a	1,0	dgl.	813	† nach 2 Tagen
a	1,5	"	158	† nach 2 Tagen
b	0,8	"	821	† nach 2 Tagen
b	1,0	"	867	† nach 2 Tagen
b	2,0	"	658	kl. Infiltrat, Nekrose, † nach 16 Tagen
c	1,0	"	.	† nach 2 Tagen
c	2,0	"	.	† nach 2 Tagen
c	3,0	"	.	† nach 2 Tagen
c	4,0	"	816	† nach 2 Tagen

Tabelle II.

Serum	Wert nach Ehrlich	Serummenge	Antitoxin-einheiten	Resultat
Kondor	100-fach	0,001	0,1	† nach 2 Tagen
"	"	0,005	0,5	lebt
"	"	0,008	0,8	lebt
Laertes	150-fach	0,001	0,15	† nach 2 Tagen
"	"	0,004	0,6	lebt
"	"	0,006	0,9	lebt
Loki	600-fach	0,0008	0,48	† am 4. Tag
"	"	0,001	0,6	lebt

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß alle Sera sich als toxolabil erwiesen, indem nach Berechnung von Mischung a 0,8 ccm, von Mischung b 0,73, von Mischung c 0,7 einer IE entsprechen würde. Mit diesen 3 Seris stellten wir nun kurative Versuche an, und das Resultat ist in Tabelle II ersichtlich.

Die drei verschiedenwertigen Sera, sämtlich toxolabil, erwiesen sich im Tierversuch als ziemlich gleichwertig, indem 0,5 AE des 100-fachen, 0,6 des 150-fachen und 0,6 des 600-fachen Serums heilen.

Da das Resultat dieses Versuches zur Beantwortung unserer Frage nicht verwendet werden konnte, haben wir eine zweite Versuchsreihe angestellt.

## II. Versuch.

10-fach überkompensierte Gemenge mit einem Verhältnis von IE:TE wie 10:1 mit verschiedenen hochwertigen Seris und einem Gift, dessen  $L_+$ -Wert 0,7 ccm beträgt.

## 1) Serum Kurier 70-fach:

$$7\frac{1}{7} \text{ ccm S} = 500 \text{ IE} + 35 \text{ ccm Toxin} = 50 \text{ TE.}$$

## 2) Serum Laertes 160-fach:

$$1 \text{ ccm S} = 160 \text{ IE} + 12 \text{ ccm T} = 16 \text{ TE} + 2 \text{ ccm NaCl.}$$

## 3) Serum Landsknecht 500-fach:

$$1 \text{ ccm S} = 500 \text{ IE} + 35 \text{ ccm T} = 50 \text{ TE} + 6 \text{ ccm NaCl.}$$

## 4) Serum Marschiall 120-fach:

$$1 \text{ ccm S} = 120 \text{ IE} + 9 \text{ ccm T} = 12 \text{ TE} + 5 \text{ ccm NaCl.}$$

## 5) Serum Hans 350-fach:

$$0,5 \text{ ccm S} = 175 \text{ IE} + 12,25 \text{ ccm T} = 17,5 \text{ TE} + 2,25 \text{ ccm NaCl.}$$

## 6) Serum Landsturm 400-fach:

$$0,5 \text{ ccm S} = 200 \text{ IE} + 15 \text{ ccm T}^1) = 20 \text{ TE} + 4,5 \text{ NaCl.}$$

## 7) Serum Meta 120-fach:

$$1 \text{ ccm S} = 120 \text{ IE} + 9 \text{ ccm T}^1) = 12 \text{ TE} + 5 \text{ ccm NaCl.}$$

Diese Mischungen wurden an Meerschweinchen ausgewertet, und das Resultat dieser Auswertung ist in Tabelle III ersichtlich.

Tabelle III.

Nummer der Mischung	Menge der Mischung	Toxin	Meerschweinchen No.	Resultat
1	0,095	0,7	667	lebt
1	0,15	0,7	860	lebt
2	0,11	0,75	794	+ nach 2 Tagen
2	0,2	0,75	939	glatt — lebt
3	0,095	0,7	119	+ nach 2 Tagen
3	0,15	0,7	754	+ nach 2 Tagen
3	0,25	0,7	869	+ nach 3 Tagen
4	0,14	0,75	982	+ nach 3 Tagen
4	0,2	0,75	974	Strang, lebt
5	0,1	0,75	952	+ nach 1 Tag
5	0,15	0,75	831	+ nach 1 Tag
6	0,11	0,75	967	+ nach 2 Tagen
6	0,2	0,75	994	Infiltrat, lebt
7	0,14	0,75	820	+ am 2. Tag
7	0,2	0,75	917	lebt

1) Die beiden letzten Mischungen wurden mit einem Toxin dargestellt, dessen  $L_{50}$ -Wert 0,75 ccm beträgt.

In diesem Versuche erweist sich das 70-fache Serum Kurier als vollständig stabil, das 500-fache Serum Landsknecht als toxolabil, ebenso das 350-fache Serum Hans, die übrigen Sera weisen zwar auch einen geringen Verlust an IE auf, der jedoch nicht so bedeutend ist, um dieselben den toxolabilen Seren einzu-reihen.

Der kurative Versuch mit diesen Seris ist in nach-folgender Tabelle zusammengestellt (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Serum	Wert nach Ehrlich	Serummenge	Antitoxin-einheiten	Resultat
Kurier	70-fach	0,0008	0,056	+ nach 2 Tagen
"	"	0,001	0,07	+ nach 2 Tagen
"	"	0,005	0,35	+ nach 2 Tagen
"	"	0,01	0,7	lebt
Laertes	160-fach	0,001	0,16	+ nach 8 Tagen
"	"	0,003	0,48	+ nach 5 Tagen
"	"	0,006	0,96	+ nach 4 Tagen
"	"	0,007	1,12	+ nach 8 Tagen
"	"	0,008	1,28	+ nach 6 Tagen
"	"	0,01	1,6	+ nach 11 Tagen
"	"	0,02	2,2	lebt
Landsknecht	500-fach	0,0008	0,4	+ nach 5 Tagen
"	"	0,001	0,5	+ nach 2 Tagen
"	"	0,003	1,5	lebt
Marschall	120-fach	0,001	0,12	+ nach 2 Tagen
"	"	0,006	0,72	+ nach 7 Tagen
"	"	0,008	0,96	lebt
"	"	0,01	1,2	lebt
Hans	350-fach	0,001	0,35	+ nach 2 Tagen
"	"	0,003	1,05	+ nach 5 Tagen
"	"	0,004	1,40	+ nach 4 Tagen
"	"	0,006	2,15	lebt
Landsturm	400-fach	0,001	0,4	+ nach 11 Tagen
"	"	0,002	0,8	+ nach 15 Tagen
"	"	0,003	1,2	lebt
"	"	0,006	2,4	lebt
Meta	120-fach	0,001	0,12	+ nach 3 Tagen
"	"	0,006	0,72	+ nach 7 Tagen
"	"	0,01	1,2	+ nach 11 Tagen
"	"	0,02	2,4	lebt

Wir haben also mit 0,7 AE eines 70-fachen die-selbe Heilwirkung erzielt, wie mit 2,2 eines 160-fachen, 1,5 eines 500-fachen, 0,96 AE eines 120-fachen, 2,15 AE eines 360-fachen, 1,2 AE eines 400-fachen und 2,4 AE eines 120-fachen Serums, ein

Resultat, welches sich mit den Schlußfolgerungen in unserer ersten Mitteilung vollständig deckt.

Ueber die Beziehungen der Avidität zur Toxolabilität resp. -stabilität gibt nachfolgende Tabelle Aufschluß:

Tabelle V.

Serum	Wert nach Ehrlich	Verhalten gegenüber Toxin	Menge der angewandten Antitoxineinheiten	Resultat
Kurier	70-fach	stabil	0,7	lebt
Laertes	160-fach	schwach labil	2,2	"
Landsknecht	500-fach	labil	1,5	"
Marschall	120-fach	schwach labil	0,96	"
Hans	350-fach	labil	2,15	"
Landsturm	400-fach	schwach labil	1,2	"
Meta	120-fach	schwach labil	2,4	"

Hieraus ist ersichtlich, daß von dem toxostabilen Serum die geringste Menge von Antitoxineinheiten zur Heilung notwendig, daß aber andererseits von einem stark labilen Serum weniger Antitoxineinheiten das Tier am Leben erhielten als beinahe die doppelte Menge eines Serums, das kaum als labil zu bezeichnen ist. Wir können also aus den gefundenen Tatsachen den Schluß ziehen, daß zwischen Toxostabilität resp. -labilität und Heilwert (Avidität) eines Diphtherieserums keine proportionalen Beziehungen bestehen müssen.

#### Literatur.

Pick und Schwoner, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap., Bd. 1.  
Kraus und Schwoner, Centralbl. f. Bakt., 1908.

### Chemotherapeutische Versuche mit einigen neueren Atoxypräparaten bei Spirochätenkrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der experimentellen Syphilis<sup>1)</sup>.

Von Prof. Dr. Uhlenhuth und Dr. Manteufel.

Seitdem für die Chemotherapie der Infektionskrankheiten durch sorgfältige experimentelle Studien der letzten Jahre eine feste Grundlage geschaffen worden ist, sind auch die Wege,

<sup>1)</sup> Eine vorläufige Mitteilung über den gleichen Gegenstand ist in der Medizinischen Klinik, 1908, No. 43 veröffentlicht worden.

die zu einem weiteren Fortschritt auf diesem Gebiete führen, deutlicher als bisher vorgezeichnet. Die Fülle von Anregungen, die wir dem Studium des Atoxyls verdanken, sind der beste Beweis dafür. Ursprünglich (1905) seiner geringeren Giftigkeit wegen als Ersatz für die therapeutisch bei Trypanosomenkrankheiten als wirksam erkannten anorganischen Arsenpräparate von Thomas (1), und Thomas und Breinl (2) empfohlen, ist das Atoxyl dank der gemeinsamen Arbeit englischer, französischer und deutscher Forscher zurzeit bereits das experimentell am besten erforschte Medikament.

Die Bedeutung des Atoxyls für die Spirochätenkrankheiten wurde zuerst durch die im Kaiserlichen Gesundheitsamt ausgeführten Untersuchungen von Uhlenhuth, Gross und Bickel (3) erkannt, indem diese Autoren seine therapeutische Wirkung bei der Spirochätenseptikämie der Hühner mit unzweideutigem Erfolge feststellten und daraufhin Versuche bei der Syphilis anregten. In der Tat fielen die von Uhlenhuth, Hoffmann, Roscher und Weidanz (4) angestellten Versuche an syphilitisch infizierten Affen so ermutigend aus, daß das Atoxyl in der Lesserschen Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten bei der Syphilis des Menschen versucht und auch hier als „wertvolles neues Medikament zur Bekämpfung der Syphilis“ (besonders maligner, auf Quecksilber schlecht reagierender Formen dieser Krankheit) erkannt wurde. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Beobachtungen an Affen und Menschen wurden am 15. Mai 1907 von Uhlenhuth und Hoffmann in der Berliner Medizinischen Gesellschaft vorgetragen und in einer Arbeit in der Deutschen Medizinischen Wochenschrift, 1907, No. 22 veröffentlicht. Inzwischen hatte auch P. Salmon (5) überraschende Erfolge der Syphilisbehandlung mit Atoxyl mitgeteilt, die später von Hallopeau (6) bestätigt wurden. Weitere Arbeiten folgten, in denen über günstige Erfahrungen berichtet wurde (Metschnikoff, A. Neisser, Lesser u. a.).

Von experimentellen Arbeiten sei noch die Mitteilung von Uhlenhuth und Weidanz (7) erwähnt, die auf Grund von Untersuchungen bei Kaninchensyphilis eine dem Sublimat überlegene präventive Wirkung des Atoxyls nachweisen konnten.

Trotz alledem hat das Atoxyl bisher weder bei der Syphilisbehandlung die eingebürgerte Quecksilberkur verdrängen

können, noch hat es sich bei der Therapie der Trypanosomenkrankheiten als das souveräne Radikalmittel erwiesen, für das man es anfänglich gehalten hat. Und das hat seine guten Gründe. Erstens liegen die wirksamen Dosen beim Atoxyl den toxischen immerhin ziemlich nahe. Diese letzteren können bekanntlich unter Umständen zu irreparablen Schädigungen nervöser Zentralorgane (Erblindung) führen. Die Beobachtungen über Atoxylfestigkeit der Trypanosomen, auf die Ehrlich (8) zuerst hingewiesen hat, und die Erfahrungen aus der Praxis der Schlafkrankheits- und Syphilisbekämpfung weisen ja bekanntlich übereinstimmend darauf hin, daß kräftige Dosen von Atoxyl notwendig sind, um Heilerfolge zu erzielen, während eine Verteilung der Atoxylgaben auf kleinere Einzeldosen und entsprechend längere Zeiträume keine so befriedigende Wirkung ausübt. Die Gefahr, daß man mit großen Dosen die individuell verschiedene Grenze der Unschädlichkeit des Präparates überschreitet, ist also zweifellos vorhanden und der allgemeinen Einbürgerung des Atoxyls als Medikament nachteilig.

Dazu kommt zweitens der Umstand, daß das Atoxyl ziemlich rasch wieder aus dem Organismus ausgeschieden wird und infolgedessen nicht nachhaltig genug wirkt. Die Folge davon ist, daß die Applikation in kurzen Zwischenräumen wiederholt werden muß. Rezidive, die eine erneute Behandlung notwendig machen, sind darum häufig und nehmen Zeit und Geduld des Arztes und Patienten außerordentlich in Anspruch. Das erschwert die Anwendung des Atoxyls im Großen, besonders auch bei Trypanosomenkrankheiten in großen Viehbeständen. Das Bedürfnis nach einem Präparat, dem diese Mängel nicht anhaften, ist also sicher vorhanden.

Die verschiedensten Kombinationen des Atoxyls mit anderen Präparaten sind aus diesem Grunde bereits versucht und als brauchbar empfohlen worden, ohne daß sich indes bisher eine dieser Methoden allgemeine Anerkennung verschafft hat.

Ein weiteres Ergebnis experimenteller chemotherapeutischer Studien ist auch die Reduktionstheorie der Atoxylwirkung, auf Grund der Ehrlich (9) die Bearbeitung der Reduktionsprodukte dieses Präparates inaugurirt hat.

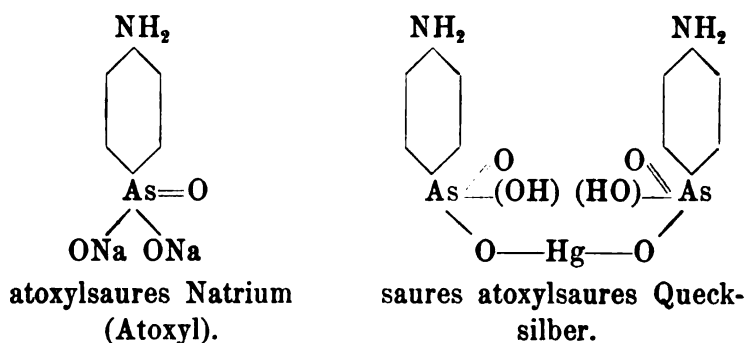
Genauer kann an dieser Stelle auf die umfangreiche Literatur über das Gebiet nicht eingegangen werden.



Die im Kaiserlichen Gesundheitsamte ausgeführten Untersuchungen der letzten Jahre haben bei Spirochäten- und Trypanosomeninfektionen eine Kombination von Atoxyl und Quecksilber für therapeutische Versuche geeignet erscheinen lassen. So konnten Uhlenhuth, Hübener und Woithe (10) bei der Dourine durch die kombinierte Anwendung von Atoxyl und Sublimat gute Dauererfolge erzielen (S. 43 des Separatabzuges). Auch Sublimat allein zeigte eine unverkennbare Wirkung auf die Dourineinfektion der Kaninchen. Ferner ergaben die therapeutischen Versuche beim Rückfallfieber, über die Manteufel (11) berichtet hat, daß das Quecksilber bei dieser Spirochätenkrankheit in kolloidaler Form einen gewissen therapeutischen Effekt hat. Daß Quecksilber im Organismus auf die Spirochäten der Syphilis einzuwirken vermag, ging hauptsächlich aus den langjährigen Erfahrungen am Menschen hervor. Auf Grund aller dieser Ergebnisse hat Uhlenhuth (12) am 24. Juni 1907 in der Sitzung des Vereins für innere Medizin in Berlin eine Kombination von Atoxyl und Quecksilber für die Behandlung der Syphilis vorgeschlagen. Bei Trypanosomenkrankheiten hatten bereits vorher Moore, Nierenstein und Todd (13) eine kombinierte Behandlung mit diesen beiden Medikamenten empfohlen. Auch A. Neisser (14) verwendet, wie er jüngst mitgeteilt hat, bei der Syphilisbehandlung eine Kombination von Quecksilber mit „Arsacetin“ (Ehrlich), einem acetylierten Atoxylpräparat.

Als Ergebnis der in letzter Zeit ausgeführten Untersuchungen wollen wir heute zunächst über ein neues Atoxylpräparat berichten, das einmal vom theoretischen Standpunkte Interesse verdient und vielleicht auch für die Syphilisbehandlung eine gewisse praktische Bedeutung hat. Es ist das saure Quecksilbersalz der p-Amidophenylarsinsäure oder, wie wir es im folgenden der Kürze halber nennen wollen, das atoxylsaure Quecksilber<sup>1)</sup>. Der Unterschied vom atoxylsauren Natrium (Atoxyl) wird durch die folgenden Konstitutionsformeln am besten veranschaulicht:

1) Woithe hat in seinem Vortrag über die Theorie der Atoxylwirkung auf dem diesjährigen Naturforschertag in Köln auf Veranlassung von Uhlenhuth bereits auf das Präparat hingewiesen.



Das Präparat ist auf Veranlassung von Uhlenhuth von den Vereinigten Chemischen Werken in Charlottenburg und von Prof. Ferd. Blumenthal dargestellt worden. Es ist ein weißes, in Wasser sehr schwer lösliches Pulver, unlöslich in Alkohol und fast allen anderen Lösungsmitteln. Es löst sich leicht in Lösungen von Halogenalkalien auf, allerdings unter Zersetzung, denn es gelingt, hieraus atoxylsaures Alkali wieder zu isolieren, während in der Lösung Halogenquecksilber ist, das durch die Gegenwart von Halogenalkali in Lösung gehalten wird. Das atoxylsaure Quecksilber enthält 31,65 Proz. Quecksilber und 23,73 Proz. Arsen<sup>1)</sup> (Analyse der Chemischen Werke). Der Arsengehalt ist also etwa der gleiche wie der des Atoxyls (24,1 Proz.).

Was das toxiologische Verhalten anlangt, so liegt nach unseren Ermittlungen

die tödliche Dosis für gesunde kräftige Ratten (150 g) bei	0,004 g
" " " " " " Kaninchen (2500 g) bei	0,2 <sup>1)</sup> "
" " " " " " Hühner (1500 g) zwisch. 0,2 u. 0,3	" "

Es muß aber ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die angegebenen Dosen nur für ausgewachsene Tiere Geltung haben, während junge, eben herangewachsene von gleichem Gewicht viel weniger widerstandsfähig sind.

Die Applikation erfolgte gewöhnlich in subkutanen oder intramuskulären Einspritzungen einer Suspension des Medikaments in einer Emulsion von Olivenöl und Gummi arabicum.

1) Blumenthal fand bei einem Kaninchen schon 0,1 g als tödliche Dosis. Das Gewicht des Kaninchens ist nicht angegeben. Wir haben ebenfalls bei der gleichen Gabe tödliche Vergiftung beobachtet, aber bei jungen Kaninchen von geringerem Gewicht.

Wie man aus der obigen Zusammenstellung ersieht, ist das Präparat im ganzen giftiger als das Atoxyl. Dabei verhalten sich indes die verschiedenen Tierarten recht auffällig verschieden. Am wenigsten resistent sind anscheinend die zahmen Ratten, denn ihnen kann man vom Atoxyl eine etwa zehnfach größere Dosis einspritzen (0,03 g). Auch Kaninchen sind ziemlich stark empfänglich und reagieren, wenn man die toxische Grenze überschreitet, mit typischen Quecksilbervergiftungen, die sich bei der Sektion in diphtherischen Geschwüren auf der Höhe der Dickdarmfalten und hämorrhagischer Nephritis äußern. Für Hühner liegt die tödliche Dosis ebenfalls niedriger als die des Atoxyls, indes vertragen sie die therapeutischen Dosen des Präparates von 0,1—0,2 g anscheinend besser als gleich große Atoxylgaben. Besonders beachtenswert erschien uns die ziemlich große Resistenz der Affen gegenüber dem Medikament. Wir haben mittelstarken Cercopitheken, die auf Atoxylgaben von 0,1 g schon deutlich mit Vergiftungserscheinungen reagierten, 0,2 bis 0,4 g des Präparates eingespritzt, ohne erhebliche allgemeine Schädigungen ihrer Gesundheit zu beobachten.

Bezeichnenderweise vertragen also im allgemeinen die Tiere das atoxylsaure Quecksilber schlecht, die sich auch gegenüber dem Quecksilber allein als wenig widerstandsfähig erwiesen haben (Ratten, Kaninchen). Auch hier bestehen z. B. zwischen Ratten, Kaninchen und Rindern einerseits, Hühnern, Schweinen und Affen andererseits auffallende Unterschiede. Beim Atoxyl sind ja ähnliche Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Tierarten ebenfalls festgestellt worden.

Zunächst wurde das atoxylsaure Quecksilber bei der experimentellen Recurrensinfektion der Ratten versucht. Obwohl von vornherein zu erwarten war, daß Ratten für solche Versuche sehr ungeeignete Versuchstiere sein würden, da sie erfahrungsgemäß sowohl Atoxyl als auch ganz besonders Quecksilber sehr schlecht vertragen, so ließen die Versuche doch die antiparasitären Eigenschaften des Präparates erkennen, denn sowohl bei gleichzeitiger Applikation von Virus und Medikament als auch beim Heilversuch konnte ein gewisser Effekt beobachtet werden. Vollständig ließ sich die Infektion

zwar in keinem Falle unterdrücken, aber es trat nicht die für den normalen Verlauf typische Ueberschwemmung des Blutes mit Parasiten ein, während bei der Anwendung unwirksamer Präparate nach unseren Erfahrungen infolge der toxischen Schädigungen des Organismus im Gegenteil eine schnellere und üppigere Entwicklung der Parasiten erfolgt. Nach allem, was unsere chemotherapeutischen Versuche bei *Recurrens* mit Atoxyl und Quecksilber allein gezeigt haben, ist zu erwarten, daß das atoxylsaure Quecksilber für Organismen, die es besser vertragen als Ratten, und dazu gehören nach unseren Beobachtungen mit Sicherheit Affen und aller Wahrscheinlichkeit nach auch Menschen, ein Medikament darstellt, das bei dieser Krankheit eines therapeutischen Versuchs wert wäre.

Daß das atoxylsaure Quecksilber auf Spirochäten eine sehr energische Wirkung ausübt, haben die weiterhin angestellten Versuche bei der Spirochätenseptikämie der Hühner bewiesen. Der Spirochätenstamm, über den wir verfügen, ist für Hühner so pathogen, daß sie in der Regel am 3.—4. Tage der Krankheit, d. h. kurz vor oder während der Krise, daran zugrunde gehen. Eine einzige Einspritzung von 0,1 g des Präparates hat nun in unseren Versuchen regelmäßig den Erfolg gehabt, daß infizierte Hühner, auch wenn sie sich zur Zeit der Einspritzung auf der Höhe der Infektion befanden und das Blut mit Spirochäten überschwemmt war, am nächsten Tage frei von Parasiten gefunden wurden — wenigstens bei mikroskopischer Untersuchung frischer Blutpräparate — und mit dem Leben davorkamen. Ist der Krankheitsprozeß noch nicht so weit vorgeschritten, dann kann man auch mit 0,04 bis 0,06 g den gleichen Heileffekt erzielen. Ebenso gelingt es, mit einer einzigen Einspritzung von 0,04—0,08 g eine gleichzeitig gesetzte Infektion der Hühner vollständig zu unterdrücken, so daß sie bei mikroskopischer Untersuchung frischer Blutpräparate dauernd frei von Parasiten bleiben. Impft man solche präventiv behandelte oder mit Hilfe des atoxylsauren Quecksilbers geheilte Hühner nach 10—14 Tagen zum zweiten Mal mit Hühnerspirochäten, dann erweisen sie sich als immun. Diese Tatsache, die in gleicher

Weise von Uhlenhuth und Gross bei der Atoxylbehandlung der Hühnerspirochätose festgestellt worden ist, verdient ein besonderes Interesse, denn sie zeigt, daß das Zustandekommen der Immunität, die nach dem natürlichen Ablauf der Krankheit beobachtet wird, durch die parasitenvernichtende Eigenschaft des Medikamentes nicht gestört wird (Tabelle I und II).

Tabelle I<sup>1)</sup>.

## Schutzversuche mit atoxylsaurem Quecksilber (HgA.).

	Tag der Infektion	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	Bemerkungen
		Tag nach der Infektion													
Huhn 474	1,0 Sp. gall. und 0,06 HgA.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
„ 475	1,0 Sp. gall. und 0,06 HgA.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
„ 499	1,0 Sp. gall. und 0,08 HgA.	.	0	0	0	0	0	0	.	.	.	.	.	.	
„ 500	1,0 Sp. gall. und 0,08 HgA.	.	0	0	0	0	0	0	.	.	.	.	.	.	
Huhn ungez.	1,0 Sp. gall. und 0,08 HgA.	.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Kontrollhuhn	1,0 Sp. gall.	0	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	Erfolg negativ

Bekanntlich kann man nach den Untersuchungen von Uhlenhuth und seinen Mitarbeitern (3 und 15) mit dem Atoxyl ähnliche präventive und kurative Erfolge bei der Spirochätose der Hühner erzielen. Dieser Umstand regte die Frage an, ob man es bei diesen Ergebnissen nicht mit einer reinen Atoxylwirkung zu tun hat und die Quecksilberkomponente des Präparates ganz irrelevant oder überflüssig ist. Gegen

1) In den Tabellen bedeutet: Sp. gall. = Hühnerspirochätencitratblut, 1,0 = 1 ccm, 0 = keine Spirochäten im frischen Blutpräparat gefunden; die Zahl der Kreuze soll schätzungsweise die Anzahl der im frischen Blutpräparat gefundenen Spirochäten veranschaulichen.

Tabelle II.

Heilversuche mit atoxylsaurem Quecksilber (HgA.).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Be- merkungen
	Tag										
Huhn 493	1,0 Sp. gall.	0	+	+++	+++	+++	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 494	1,0 Sp. gall.	0	+	+	0	0	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 495	1,0 Sp. gall.	0	+	+++	0	0	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 496	1,0 Sp. gall.	0	+	++	0	0	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 497	1,0 Sp. gall.	0	+	+++	+++	+	0+	.	.	.	
„ 524	0,1 Sp. gall.	0	0	++	0	0	0	0	0	0	

eine solche Auffassung spricht indes wohl der Umstand, daß die präventive Wirkung des atoxylsauren Quecksilbers der des atoxylsauren Natriums erheblich überlegen ist. Wie aus der Arbeit von Uhlenhuth und Gross hervorgeht, gelingt die völlige Unterdrückung der Hühnerspirochätose durch eine einzige Einspritzung von Atoxyl nur ausnahmsweise, und gelegentlich läßt sie sich auch durch öftere Injektionen nicht vollständig unterdrücken. „Wir dürfen“ — so schließen die Autoren — „aus unseren Versuchen folgern, daß eine dreimalige, an aufeinander folgenden Tagen vorgenommene Verabreichung von je 0,05 g Atoxyl im allgemeinen ausreichen wird, um infizierte Hühner vor dem Ausbruch der Spirillose zu schützen.“ — „Es ist von Interesse, zu beobachten, daß die Heilwirkung des Atoxyls anscheinend noch sicherer ist, wenn es erst gegeben wird, nachdem die Krankheit deutlich ausgebrochen ist.“

Bei den gleichen Versuchen mit einer einmaligen Einspritzung von atoxylsaurem Quecksilber haben wir demgegenüber niemals Mißerfolge zu verzeichnen gehabt und möchten in diesem Umstande einen praktisch schätzbaren Vorzug des neuen Präparates vor dem Atoxyl erblicken.

Ferner hat sich bei den Versuchen herausgestellt, daß man das atoxylsaure Quecksilber auch bei prophylaktischer Anwendung mit besserem Erfolge benutzen kann, als es nach den bisherigen Erfahrungen beim Atoxyl der Fall ist (Tabelle III). Noch 48 Stunden nach der Applikation des Medikamentes (0,06—0,08 g) kann man eine unzweideutige Wirkung des Mittels auf den Verlauf der Infektion feststellen und sie bei entsprechend größeren Dosen vollkommen unterdrücken. Ob der Schutz noch längere Zeit ausreicht, ist zurzeit noch nicht festgestellt.

Tabelle III.

Prophylaktische Versuche mit atoxylsaurem Quecksilber.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Be- merkungen
	Tag										
Huhn 479	0,06 HgA.	1,0 Sp. gall.	0	0	1	0	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 480	0,06 HgA.	.	1,0 Sp. gall.	0	1	++	0	0	0	0	Nachimpfung negativ
„ 502	0,2 HgA.	.	1,0 Sp. gall.	0	0	0	0	0	0	.	Nachimpfung negativ
„ 477	0,1 HgA.	0,5 Sp. gall.	.	0	0	0	0	0	0	.	Nachimpfung negativ
„ 518	0,1 HgA.	.	0,5 Sp. gall.	0	0	0	0	0	0	.	Nachimpfung negativ

Diese Vorzüge des atoxylsauren Quecksilbers sind für die Praxis insofern von Bedeutung, als sie eine nachhaltigere Wirkung des Medikamentes auf die Parasiten garantieren dürften.

Es war nun weiter zu untersuchen, welche Rolle in unserem Falle das Quecksilber spielt. Daß es in der gegebenen Verbindung mit dem Atoxyl im Körper zur Wirkung kommt, ist durch die bei den Kaninchen beobachtete Quecksilbervergiftung erwiesen.

Zunächst haben wir zur Lösung der Frage Heilversuche mit kolloidalem Quecksilber angestellt, das nach unseren Erfahrungen durchschnittlich besser und in höheren Dosen vertragen wird als Sublimat. Um die Versuchsbedingungen möglichst günstig zu gestalten, wählten wir dabei die intra-

venöse Applikation des Medikamentes. Man kann gesunden kräftigen Hühnern bis 0,04 g des von uns verwendeten kolloidalen Präparates intravenös verabreichen. Bei infizierten Tieren liegt die therapeutische Maximaldosis etwa bei 0,01 g. Eine Beseitigung der im Blute kreisenden Spirochäten konnten wir mit solchen Dosen indes nicht erzielen, nur eine geringe Entwicklungshemmung ließ sich bei den Versuchen feststellen (Tabelle IV). Um für einen Vergleich mit dem schwer löslichen atoxylsauren Quecksilber die Bedingungen etwas gleichmäßiger zu machen, wurden dann präventive und kurative Impfungen mit Suspensionen von salicylsaurem Quecksilber herangezogen, das bekanntlich ebenfalls im Wasser fast unlöslich ist. Dieses Präparat enthält 42 Proz. Quecksilber, also viel mehr als das Quecksilberatoxyl (31,65 Proz.).

Tabelle IV.

Heilversuche mit kolloidalem Quecksilber (Hg. coll.).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
	Tag						
Huhn 465	0,5 Sp. gall.	0	+	+	.		.
			0,01 Hg. coll.				
„ 464	0,5 Sp. gall.	0	+	+++	+++	+++	+
				0,02 Hg. coll.			
„ 459	0,5 Sp. gall.	0	0	++	+++	+	
„ ungez.	0,5 Sp. gall.	0	+	++	+++	+	
			0,02 Hg. coll.				

Die Versuche hatten das Ergebnis, daß die präventive Einverleibung von 0,1 g in einem Falle einen vollen, in einem zweiten Falle einen ausreichenden Erfolg hatte: im ersten Falle wurde die gleichzeitig gesetzte Infektion vollständig unterdrückt, im zweiten waren bei mikroskopischer Untersuchung nur am 2. Tage nach der Infektion spärliche Parasiten im Blute zu finden, während am folgenden Tage das Huhn parasitenfrei war. Die beiden Heilversuche dagegen ließen einen erheblichen Erfolg nicht erkennen: das eine Huhn starb



2 Tage nach der Anwendung des Medikamentes und zeigte geradezu eine Ueberschwemmung des Blutes mit Parasiten, das zweite kritisierte nach einem regelmäßigen Ablauf der Krankheit, blieb aber in der Folge am Leben. Das Medikament wurde bei der gewählten Dosis (0,1 g) in allen Fällen im Gegensatz zum Sublimat und kolloidalen Quecksilber von den Hühnern sehr gut vertragen (Tabelle V). Die empirisch erprobte Wirksamkeit des Quecksilbers bei der Syphilis findet mithin in diesen Versuchen an der Spirochätenkrankheit der Hühner eine einwandfreie experimentelle Stütze. Man muß aus

Tabelle V.

Schutz- und Heilversuche mit salicylsaurem Quecksilber (Hg. sal.).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
	Tag								
Huhn 511	0,5 Sp. gall.	0	0	+	+++	†	.	.	.
				0,1 Hg. sal.					
„ 512	0,5 Sp. gall.	0	+	++	+++	0	0	0	0
				0,1 Hg. sal.					
„ 513	0,5 Sp. gall. und 0,1 Hg. sal.	0	0	0	0	0	0	0	0
„ 514	0,5 Sp. gall. und 0,1 Hg. sal.	0	+	0	0	0	0	0	0

den Versuchen aber wohl schließen, daß sich das salicylsaure Quecksilber im Tierversuch annähernd umgekehrt verhält wie das Atoxyl, denn das letztere versagt gelegentlich bei der präventiven Anwendung und wirkt besser im Heilversuch, während das salicylsaure Quecksilber seine Wirksamkeit deutlich nur im Präventivversuch zeigte.

Das Ergebnis dieser Versuche beweist also erstens, daß das salicylsaure Quecksilber dem atoxylsauren Quecksilber nicht gleichwertig ist. Das letztere verdient vielmehr einen gewissen Vorzug, und zwar zeigt sich dieser hauptsächlich bei der Anwendung nach stattgehabter Infektion. Da es sich in diesem Falle um eine geringere Menge reinen Quecksilbers

handelt, das einverleibt wird, so muß die Ueberlegenheit des atoxylsauren Quecksilbers in anderen Gründen gesucht werden. Jedenfalls steht so viel fest, daß die günstigen Erfolge damit nicht ausschließlich als Quecksilberwirkung aufzufassen sind.

Andererseits müßte man aber aus dem Vergleich der Ergebnisse mit dem kolloidalen Quecksilber und dem salicylsauren Quecksilber den Schluß ziehen, daß das letztere Präparat therapeutisch weit rationeller ist, da man mit einer einmaligen Einspritzung relativ bessere Resultate erzielen kann und dabei den Organismus weniger schädigt. Berücksichtigt man, daß die therapeutisch anwendbare Einzeldosis bei Hühnern für Sublimat bei 0,002 (0,002 Sublimat = 0,00148 Hg) und für kolloidales Quecksilber bei höchstens 0,02 liegt (0,02 kolloidales Quecksilber = 0,005 Hg), während man vom salicylsauren Quecksilber 0,1 und mehr geben kann (0,1 salicylsaures Quecksilber = 0,042 Hg), so ergibt sich, daß man mit Hilfe des letzteren viel größere Mengen Quecksilber einverleiben kann. Die nachgewiesene bessere Wirkung des unlöslichen Quecksilbersalzes auf die Parasiten wird also durch die erheblich größere Quecksilberzufuhr ganz verständlich gemacht.

Man dürfte also auch nicht fehlgehen, wenn man die dem löslichen Atoxyl überlegene günstige Wirkung des atoxylsauren Quecksilbers zum Teil auf die schwere Löslichkeit des Präparates bezieht und diese als einen Vorzug betrachtet. Daß es aber im Heilversuche bessere Resultate ergibt als das salicylsaure Quecksilber, weist unseres Erachtens darauf hin, daß die Resorptionsbedingungen in diesem Falle bessere sind oder eine raschere Einwirkung auf die Parasiten im Organismus gestatten, und diese Eigenschaft dürfte wohl der Tätigkeit der Atoxylkomponente zukommen. Die chemischen Untersuchungen (siehe oben) lassen darauf schließen, daß das atoxylsaure Quecksilbersalz durch die kochsalzhaltigen Organsäfte in Atoxyl- und Halogenquecksilber gespalten wird. In letzter Linie beruht also die Wirkung des Präparates auf der Kombination von Atoxyl und Sublimat.

Für diese sind aber, wie die Versuche erweisen, bei dem unlöslichen atoxylsauren Quecksilber viel günstigere Resorptionsbedingungen vorhanden, die ihm über eine gleichzeitige Applikation von Atoxyl und Sublimat nebeneinander ein praktisch wertvolles Uebergewicht verschaffen. Wir glauben in der Tat, daß die Kombination des Atoxyls mit einem schwerlöslichen Quecksilbersalz eine sich gegenseitig gut ergänzende Wirkung dieser zwei spirochätenfeindlichen Substanzen ermöglicht: das leicht resorbierte Atoxyl beseitigt wohl die große Masse der Hühnerspirochäten, während das langsamer aufgenommene und weniger rasch wieder ausgeschiedene Quecksilbersalz die etwa übriggebliebenen oder atoxylresistenten Parasiten vernichtet und ein Wiederaufflackern der Infektion verhindert.

Der Wert dieser chemotherapeutischen Studien ist für unsere Verhältnisse zunächst ein mehr theoretischer. Denn die Spirochätenkrankheit der Hühner kommt in unseren Gegenden anscheinend nicht vor. Jedoch dürften unsere Untersuchungen für die Bekämpfung der Hühnerspirochätose in ihrem Heimatlande (Brasilien etc.) ein praktisches Interesse beanspruchen.

Von größerer praktischer Wichtigkeit sind unsere Versuche, mit Hilfe des atoxylsauren Quecksilbers die experimentelle Syphilis therapeutisch zu beeinflussen.

Die Versuche bei der Hofnautsyphilis der Kaninchen haben die beim Studium der Hühnerspirochätose gewonnenen theoretischen Vorstellungen bestätigt und sind so eindeutig ausgefallen, daß wir den Bericht darüber kurz fassen können. Obgleich man den Kaninchen wegen der eingangs erwähnten geringen Resistenz gegen Quecksilber relativ kleinere Dosen als Hühnern einverleiben kann, so gelingt es doch, mit einer einmaligen Einspritzung von 0,06 g des atoxylsauren Quecksilbers eine maximal entwickelte syphilitische Keratitis in 5—6 Tagen vollständig zum Schwinden zu bringen. Ob man mit einer noch geringeren Dosis ähnliche Resultate erzielen könnte, ist bisher noch nicht festgestellt worden. Weder mit Sublimat allein noch mit salizylsaurem Quecksilber allein, noch mit Atoxyl allein ist ein derartig rascher Erfolg zu erzielen.

Unbehandelte Kontrolltiere, die bei den Versuchen in großer Anzahl zur Verfügung standen, haben einen entsprechenden Rückgang der Erscheinungen niemals erkennen lassen. Dagegen hat sich auch hier wieder die Ueberlegenheit der unlöslichen Quecksilbersalze über das lösliche Sublimat gezeigt, denn es gelingt auch mit einer einmaligen Einspritzung von salicylsaurem Quecksilber, eine Hornhautsyphilis zur Abheilung zu bringen — allerdings nicht so schnell, wie mit unserem Präparat.

Daß wir nicht in allen Fällen mit einer einzigen Einspritzung die richtige Dosis getroffen haben, geht aus folgenden Beobachtungen hervor.

Von 5 Kaninchen, deren Hornhautsyphilis nach einer Einspritzung vollkommen zurückging, haben wir späterhin bei einem Tiere ein Rezidiv beobachtet.

Der Verlauf der Infektion bei diesem Tier gestaltete sich folgendermaßen: Es wurde am 5. Okt. in Behandlung genommen. Körpergewicht 2320 g. L. Hornhaut in ganzer Ausdehnung vollkommen trüb, r. Hornhaut zeigt eine geringere, in der oberen Hälfte beginnende Trübung und starke perikorneale Injektion.

5. Okt. 0,08 Hg Atoxyl subkutan Rücken.

7. Okt. Allgemeinbefinden gut. L. Cornea anscheinend weniger trüb.

8. Okt. L. Trübung deutlich aufgehellt, r. ist die perikorneale Injektion geschwunden.

11. Okt. Beide Hornhäute vollständig klar und durchsichtig. Gewicht 2145 g.

18. Okt. Ebenso.

27. Okt. Deutliche Trübung der r. Hornhaut, l. Hornhaut ohne Befund.

Das atoxylsaure Quecksilber wirkt also auch gegenüber den Spirochäten der Syphilis nachhaltiger als das Atoxyl und erfordert ferner zur ausreichenden Wirkung nicht die Einverleibung so großer Arsendosen, daß die Gefahr einer Atoxylvergiftung heraufbeschworen wird: es füllt also in dieser Beziehung Mängel aus, die wir eingangs als der Atoxylanwendung in der Praxis nachteilig bezeichnet haben.

Was das Verhalten des atoxylsauren Quecksilbers bei Trypanosomenkrankheiten anlangt, so haben wir bei Versuchen mit Nagana und Dourine an Ratten fast gar keine Erfolge

gesehen. Sie sind jedenfalls weit schlechter ausgefallen, als die eingangs erwähnten Recurrensversuche an Ratten. Gegenüber den experimentellen Trypanosomeninfektionen der Ratten ist das Präparat dem Atoxyl allein jedenfalls unterlegen. Es wäre indes wohl vor der Hand noch nicht richtig, aus diesen Resultaten auf eine Unwirksamkeit des Präparates bei Trypanosomenkrankheiten überhaupt zu schließen. Vielmehr möchten wir meinen, daß Ratten infolge ihrer geringen Widerstandsfähigkeit gegen Quecksilber und Quecksilberatoxyl zur Lösung dieser Frage ganz ungeeignete Versuchstiere sind. Wir haben darauf bereits bei der Besprechung der Recurrensversuche hingewiesen. Leider sind die seit einiger Zeit im Gang befindlichen Kaninchenversuche mit Nagana und Dourine durch den Zutritt einer Seucheninfektion, der der größere Teil der Tiere erlegen ist, gestört worden. Zurzeit können wir daher nur berichten, daß je ein mit Nagana und Dourine infiziertes und gleichzeitig mit einer Einspritzung von 0,2 bzw. 0,12 g behandeltes Kaninchen bisher von der Infektion verschont geblieben ist, während die Kontrolltiere und ein mit 0,08 g präventiv behandeltes Naganakaninchen erkrankt sind. Bevor indes ein endgültiges Urteil über die Wirkung des atoxylsauren Quecksilbers bei Trypanosomeninfektionen abgegeben werden kann, müssen die weiteren im Gange befindlichen Versuche an Kaninchen abgewartet werden. Immerhin gewinnt man aus den bisherigen Ergebnissen den Eindruck, als ob die Wirkung des atoxylsauren Quecksilbers auf Spirochäten ungleich energischer ist als auf Trypanosomen.

Im Reagenzglas anterscheidet sich das atoxylsaure Quecksilber vom atoxylsauren Natrium wesentlich dadurch, daß das erstgenannte Salz, obgleich in Wasser nur in Spuren löslich, auf Trypanosomen und Spirochäten in 4-proz. Lösung mikrobi-zid wirkt, während diese Lebewesen in gleich und höher konzentrierten Lösungen des in Wasser leicht löslichen Atoxyls am Leben bleiben.

Die Applikation des atoxylsauren Quecksilbers in Salbenform hat bei der Spirochätose der Hühner und der experi-

mentellen Recurrens der Ratten in keiner der verschiedenen Versuchsanordnungen befriedigende Ergebnisse geliefert. Das ist auffallend, weil das Atoxyl bei der Verwendung als Salbe sehr gute Resultate liefert. Anscheinend findet das Präparat von der Haut aus nicht die günstigen Resorptionsbedingungen vor, die bei der Einverleibung unter die Haut seine Wirksamkeit bedingen.

Wie alle Quecksilbersalze hat auch das atoxylsaure Quecksilber den Nachteil, daß es bei subkutaner Anwendung örtliche Nekrosen macht und infolgedessen nur intramuskulär eingespritzt werden kann.

Ein weiteres Atoxylderivat, das wir im Verlauf der Untersuchungen bei der Spirochätose der Hühner versucht haben, ist das ebenfalls von den Vereinigten Chemischen Werken in Charlottenburg hergestellte acetylatoxylsaure Quecksilber. Das Präparat ist gleichfalls sehr schwer in Wasser löslich. Die tödliche Dosis für Hühner liegt anscheinend nur um eine Kleinigkeit höher als bei dem nicht acetylierten Produkt (0,3 g). Auch für Kaninchen ist das Präparat nach unseren und Blumenthals (16) Versuchen nicht wesentlich ungiftiger als das atoxylsaure Quecksilber. Sein Wirkungsmechanismus bezüglich Prophylaxe, Präventivbehandlung und Heilerfolg ist der gleiche wie bei dem anderen Präparat, allerdings sind auch die therapeutischen Dosen etwas höher zu wählen als bei jenem. Die Tabelle VI gibt einige der bezüglichen Versuche wieder.

Da von der weiteren Prüfung des Präparates wesentlich neue Gesichtspunkte nicht erwartet wurden, haben wir uns mit der Feststellung der angeführten Tatsachen begnügt.

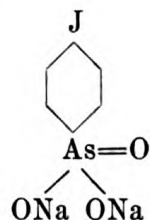
Während also die Kombination von Atoxyl und Quecksilber in einer zweckmäßigen Form bei Spirochäteninfektionen einen therapeutischen Fortschritt zu bedeuten scheint, haben wir im Gegenteil von der Einführung des Jods in das Atoxylmolekül eigentlich nur Nachteile gesehen. Freilich handelte es sich bei den beiden Jodpräparaten, die wir zu untersuchen Gelegenheit hatten, um Produkte, bei denen das Jod am Kern der Arsanilsäure sitzt. Das eine,

Tabelle VI.

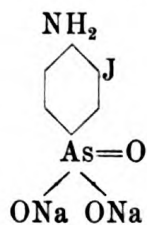
Präventive, prophylaktische und Heilversuche mit acetylatoxylsaurem  
Quecksilber (HgArs.).

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Be- merkungen
	Tag										
Huhn 412	1,0 Sp. gall. und 0,08 HgArs.	0	0	+	++	++	++	+	.	.	—
„ 461	1,0 Sp. gall. und 0,08 HgArs.	0	0	++ 0,04 HgArs.	0	0	0	0	+	.	—
„ 507 <sub>i</sub>	1,0 Sp. gall. und 0,2 HgArs.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Nachimpf. negativ
„ 508	0,2 HgArs.	.	1,0 Sp. gall.	0	0	0	++	0	0	0	Nachimpf. negativ
Huhn rot- braun	1,0 Sp. gall.	0	+	0	0	0	0	0	0	0	Nachimpf. negativ
Huhn perlgrau	1,0 Sp. gall.	0	+	+++ 0,08 HgArs.	0	0	0	0	0	.	Nachimpf. negativ

von Ferd. Blumenthal und Friedr. Herschmann (17)  
dargestellt und genauer beschrieben, hat die Konstitutions-  
formel:



Das zweite ist von den Vereinigten Chemischen Werken  
dargestellt worden und entspricht der Formel



Es handelt sich bei beiden Präparaten um in Wasser lösliche Verbindungen, die sich dadurch unterscheiden, daß das Jod im ersten Falle in p-, im zweiten in m-Stellung zum Arsen steht. Ferner ist beim zweiten die Amidogruppe erhalten, während sie beim ersten fehlt. Beide Präparate sind durch die Jodierung ganz erheblich giftiger geworden als das Atoxyl. Bei dem p-jodphenylarsinsäuren Natrium, dem „Jodatoxyl“, haben Blumenthal und Herschmann das bereits an Kaninchen festgestellt. Wir können es in Bezug auf Hühner und Ratten bestätigen. Für gesunde Hühner z. B. liegt die tödliche Dosis beider Präparate schon unter 0,1 g. Ebenso wie Blumenthal für Kaninchen, haben auch wir für Hühner einen erheblichen Unterschied in der Giftigkeit bei den Präparaten nicht beobachtet, d. h. die Amidogruppe läßt hier eine ausschlaggebende Wirkung auf die Giftigkeit nicht erkennen. Für kranke oder gleichzeitig mit Hühnerspirochäten infizierte Tiere liegt die tödliche Dosis nach unseren Erfahrungen noch weit niedriger, so daß therapeutische Dosen mit 0,02—0,03 g schon hoch gegriffen sind. Einen wesentlichen Einfluß auf den Infektionsverlauf haben wir bei Anwendung solcher und höherer Dosen, die später den Tod der Tiere verursachten, bei der Spirochätenseptikämie der Hühner nicht beobachtet. Da das „Jodatoxyl“ nach der Analyse von Blumenthal und Herschmann 22,8 Proz. Arsen enthält, also nicht viel weniger als das Atoxyl, so mußte man daraus den Schluß ziehen, daß die Einführung von Jod in das Atoxylmolekül sowohl die Giftigkeit erhöht, als auch die Wirksamkeit gegenüber Hühnerspirochäten herabsetzt.

Ferner haben wir im Verlauf der Untersuchungen auch das Quecksilbersalz der p-Jodphenylarsinsäure geprüft, das uns von Herrn Professor Blumenthal zur Verfügung gestellt wurde (tödliche Dosis für gesunde Hühner zwischen 0,1—0,2 g). Es ist das dem Jodatoxyl entsprechende Quecksilbersalz. Wie Blumenthal (16) bereits bei Kaninchen feststellen konnte, ist das Präparat auch für Hühner erheblich weniger giftig als das entsprechende Natriumsalz. Man steht damit der zunächst



paradox erscheinenden Tatsache gegenüber, daß ein stark toxisches Medikament (Jodatoxyl) durch die Einführung eines an und für sich für den lebenden Organismus ebenfalls ziemlich giftigen Elements (Quecksilber) an Giftigkeit verliert. Unserer Ansicht nach findet diese Erscheinung darin eine ausreichende Erklärung, daß das jodphenylarsinsäure Natrium ein in Wasser leicht lösliches und im Organismus leichter resorbierbares Präparat darstellt als das in Wasser fast unlösliche Quecksilbersalz. Nach unseren Versuchen ist das Präparat für Hühner jedenfalls auch giftiger als die nicht jodierten Quecksilberprodukte (atoxylsaures und acetylatoxylsaures Quecksilber). In therapeutischer Hinsicht unterscheidet sich das jodphenylarsinsäure Quecksilber von dem entsprechenden Natriumsalz und dem Natriumsalz der Jodamidophenylarsinsäure dadurch, daß es in etwa den gleichen Dosen wie die anderen Quecksilbersalze dieser Gruppe auf Hühnerspirochäten einwirkt. Irgendwelche Vorzüge vor anderen Quecksilberpräparaten haben wir dabei an ihm aber nicht feststellen können, dagegen ist es, wie erwähnt, giftiger als die nicht jodhaltigen Quecksilberverbindungen. Es hat demnach den Anschein, als ob die spirochätenfeindlichen Eigenschaften des Jods, die A. Neisser bei der Syphilis im Experiment nachgewiesen hat (18), bei der Spirochätenkrankheit der Hühner nicht so deutlich zum Ausdruck kommen.

#### Zusammenfassung.

Auf Grund der durch die Versuche bei der Hornhautsyphilis der Kaninchen und der Hühnerspirochätose bewiesenen günstigen Erfolge glauben wir das atoxylsaure Quecksilber zu Versuchen in der Therapie der menschlichen Syphilis empfehlen zu können. Es vereinigt anscheinend in sich in zweckmäßiger Weise die Vorzüge des Atoxyls und Quecksilbers und gestattet infolgedessen vielleicht auch beim Menschen eine Dosierung, bei der man die nachteiligen Wirkungen des Atoxyls nicht zu fürchten braucht. Für die menschliche Therapie ist dabei der Umstand günstig, daß das Präparat gut vertragen wird, und daß erfahrungsgemäß die Resistenz gegenüber dem Quecksilber beim Menschen eine ziemlich große ist.

Falls sich für Trypanosomenkrankheiten die Kombination von Quecksilber und Arsen, wie sie im atoxylsauren Quecksilber gegeben ist, wegen der im Vergleich zum Atoxyl geringeren Arsenszufuhr als nicht geeignet erweisen sollte, dann dürfte es sich auf Grund der vorliegenden Untersuchungen vielleicht empfehlen, Atoxyl und ein unlösliches Quecksilbersalz nebeneinander oder nacheinander anzuwenden. Das letztere scheint uns von besonderer Bedeutung zu sein mit Rücksicht auf die von Ehrlich festgestellte Tatsache, daß die Atoxylfestigkeit der Trypanosomen eine Arsenfestigkeit überhaupt bedeutet. Die kombinierte Therapie mit verschiedenen chemischen Elementen — etwa zuerst Arsen und dann Quecksilber — scheint auf Grund der vorliegenden Tatsachen daher aussichtsvoller zu sein als die Anwendung eines einzigen Elements als Heilprinzip. Nach einer gründlichen Behandlung mit einem Arsenpräparat (Atoxyl oder Reduktionsprodukt) dürfte eine Quecksilberkur von großem Nutzen sein. In diesem Sinne eignet sich das Präparat daher vielleicht auch für die Nachbehandlung bei der Schlafkrankheit.

#### Nachtrag.

Inzwischen haben wir Gelegenheit gehabt, drei weitere Atoxylpräparate zu untersuchen, die Jod und Quecksilber im Kern der Arsanilsäure enthalten. Im Versuch bei Hühnerspirochäten haben alle drei Präparate neben einer größeren Giftigkeit auch geringere therapeutische Wirksamkeit gezeigt, als die oben besprochenen Quecksilbersalze.

Ferner sind wir durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Geheimrat Ehrlich in die Lage versetzt worden, das Arsenophenylglycin, ein Reduktionsprodukt des Atoxyls, das bei Trypanosomeninfektionen eine dem Atoxyl überlegene Wirkung ausübt, auch auf das Verhalten gegenüber Spirochäten zu prüfen. Bekanntlich ist das Atoxyl außer bei Trypanosomenkrankheiten auch bei der Spirochätenseptikämie der Hühner und der experimentellen Syphilis sowie auch bei Frambösie therapeutisch sehr wirksam, während gegenüber den Spirochäten des Rückfallfiebers — an Ratten wenigstens

— keine so günstigen Erfolge zu erzielen sind. Auch das Arsenophylglycin hat bei Versuchen an Ratten mit Spirochäten der russischen *Recurrentis* keine Wirkung gezeigt, weder im Heilversuch, noch bei gleichzeitiger Applikation von Virus und Präparat, noch bei prophylaktischer Verwendung.

Besser sind dagegen die Ergebnisse bei der Hühnerspirochätose, wie aus der folgenden Tabelle VII zu entnehmen ist.

Tabelle VII.

Prophylaktische Präventiv- und Heilversuche mit Arsenophylglycin Ehrlich (S. 418)<sup>1)</sup>.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Tag							
Huhn 543	1,0 Sp. gall.	0	+	+	0	0	0	0
			0,05 S. 418					
„ 544	1,0 Sp. gall.	0	+	++	0	0	0	0
			0,05 S. 418					
„ 545	1,0 Sp. gall. und 0,05 S. 418	0	0	+	0	0	0	0
„ 546	1,0 Sp. gall. und 0,05 S. 418	0	0	0	0	0	0	0
„ 547	0,05 S. 418	1,0 Sp. gall.	0	0	0	0	0	0
„ 548	0,05 S. 418	1,0 Sp. gall.	0	0	0	0	0	0
„ 530	1,0 Sp. gall.	0	+	+++ 0,05 S. 418	++	0	0	0
„ 531	1,0 Sp. gall.	0	+	+++ 0,05 S. 418	+++	0	0	0

Wir sehen also auffälligerweise bei der prophylaktischen Anwendung des Präparates 24 Stunden vor der Infektion (Huhn 547 und 548) einen vollständigen Erfolg, ebenso gelingt die Unterdrückung der Infektion bei gleichzeitiger Ver-

1) S. 418 = Arsenophenylglycin. Bei Huhn 543—548 wurde die Einspritzung intramuskulär, bei 530 und 531 intravenös gemacht.

abreichung von Virus und Medikament (Huhn 545 und 546). Dagegen haben wir bei der kurativen Verwendung eine ausreichende Wirkung nur in dem Falle gesehen, wenn die Applikation des Präparates bald in den ersten Stadien der mikroskopisch nachweisbaren Infektion erfolgte (Huhn 543 und 544). Tiere, die sich auf der Höhe der Infektion befinden (Huhn 530 und 531), sind aber anscheinend auch bei intravenöser Anwendung des Präparates durch eine einmalige Injektion von 0,05 g, d. h. einer Gabe, die nach unseren Erfahrungen annähernd die Maximaldosis für infizierte Hühner darstellt, nicht mehr zu heilen. Eine therapeutische Wirkung des Präparates könnte man in den letztgenannten Versuchen allenfalls darin erblicken, daß die Hühner am Leben geblieben sind.

Mit Atoxyl gelingt die Beseitigung der Hühnerspirochäten bei Verwendung einer einmaligen Dosis von 0,04 g ganz prompt, auch, wenn das Blut mit Parasiten überschwemmt ist. Das Gleiche beweisen die Versuche mit atoxylsaurem und acetylatoxylsaurem Quecksilber in Tabelle II und VI.

Daß dem Arsenophenylglycin bei den Trypanosomen-Infektionen eine Ueberlegenheit gegenüber dem Atoxyl zukommt, scheint uns nach Versuchen an Rattentrypanosomen (*Tr. lewisi*) sehr wahrscheinlich, die wir in letzter Zeit angestellt haben. Während alle bisher geprüften Chemikalien, auch wenn sie bei pathogenen Trypanosomen im Experiment wirksam waren, diesen Flagellaten gegenüber im Stich ließen, gelingt eine präventive und kurative Beeinflussung dieser Infektion mit Hilfe des Arsenophenylglycins vollkommen. Wenn sich auch ein praktisch brauchbarer Vorzug des neuen Reduktionspräparates erst an den Dauererfolgen bei der Behandlung der Infektionen mit pathogenen Trypanosomen richtig bewerten lassen wird, halten wir diese Beobachtung doch für sehr beachtenswert.

Gegenüber der Ueberlegenheit des Arsenophenylglycins über das Atoxyl bei Trypanosomen finden wir also eine Wirkung bei Spirochäten, die der des Atoxyls zum mindestens nicht überlegen ist.

Bei Reagenzglasversuchen mit dem neuen Ehrlichschen Präparat ist uns aufgefallen, daß es auf Rattentrypanosomen in der Verdünnung 1:200, die wir zur Einspritzung bei Ratten und Hühnern benutzt haben, eine relativ geringe parasitizide Fähigkeit zeigt, namentlich gegenüber den Rattentrypanosomen. Ob sich dieses Verhalten mit einer direkten trypanoiden Wirkung des Präparates im Tierkörper vereinbaren läßt, darüber können erst weitere experimentelle Untersuchungen Aufklärung geben.

#### Literaturverzeichnis.

- 1) Thomas, H. W., The experimental treatment of trypanosomiasis in animals. Proc. Royal Society, 1905.  
Derselbe, Some experiments in the treatment of trypanosomiasis. Brit. med. Journ., 1905, p. 1140 (27. Mai).
- 2) Thomas, H. W., and Breinl, A., Trypanosomes, Trypanosomiasis and sleeping sickness. Liv. School of trop. Med., Mem. 16, 1905.
- 3) Uhlenhuth, Gross und Bickel, Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyls auf Trypanosomen und Spirochäten. Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 4.
- 4) Uhlenhuth, Hoffmann und Roscher, Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyls auf die Syphilis. Deutsche med. Wochenschrift, 1907, No. 22.
- 5) Salmon, P., L'arsenic dans la syphilis. Comptes rend. Soc. Biol., 1907 (22. März und 19. April).
- 6) Hallopeau, Sur le traitement de la syphilis par l'anilarsinate de soude suivant le procédé de M. Paul Salmon. Bull. général de thérapeutique, 1907 (23. Juni).
- 7) Uhlenhuth und Weidanz, Untersuchungen über die präventive Wirkung des Atoxyls im Vergleich mit Quecksilber bei der experimentellen Kaninchensyphilis. Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 20.
- 8) Ehrlich, P., Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 9—12.
- 9) Ehrlich, P., Moderne Chemotherapie. Vortrag, gehalten gelegentlich der 10. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 8. Juni 1908.
- 10) Uhlenhuth, Hübener und Woithe, Experimentelle Untersuchungen über Dourine mit besonderer Berücksichtigung der Atoxylbehandlung. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 27, 1907.
- 11) Manteufel, Weitere Untersuchungen über Recurrens. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 29, 1908.

9\*

- 12) Uhlenhuth, Demonstration von mit Atoxyl behandelten Dourinekaninchen. Verein für innere Medizin, 24. Juni, 1907. Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 30.
- 13) Moore, Nierenstein and Todd, A note on the therapeutics of trypanosomiasis. Ann. of trop. Med., Vol. 1, No. 1 (Febr. 1907).
- 14) Neisser, A., Ueber die Verwendung des Arsacetins (Ehrlich) bei der Syphilisbehandlung. Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 35.
- 15) Uhlenhuth und Gross, Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyls auf die Spirillose der Hühner. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 27, 1907.
- 16) Blumenthal, Ferd., Ueber Konstitution und Giftwirkung verschiedener Körper der Atoxylgruppe. Med. Klinik, 1908, No. 44.
- 17) Blumenthal, Ferd., und Herschmann, Friedr., Biochemische Untersuchungen über die Jodphenylarsinsäure. Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 26, und Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908, Heft 3/4.
- 18) Neisser, A., Atoxyl bei Syphilis und Framboesia. Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 38 und 43.

---

[Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.; Direktor Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich.]

### **Beiträge zur Theorie und Praxis der Wassermannschen Syphilisreaktion.**

#### **Ueber den Ersatz der Organextrakte bei der Reaktion.**

Von Prof. **Hans Sachs** und Dr. **Pietro Rondoni-Florenz**.

Durch die etwa gleichzeitig von Wassermann-Porges-Meier, Landsteiner-Müller-Pötzl und Levaditi-Yamanouchi entdeckte Tatsache, daß die bei der Wassermannschen Reaktion wirksamen Stoffe der Organextrakte alkohollöslich sind, waren für das Verständnis des Wesens der durch die Untersuchungen Wassermanns erwiesenen eigenartigen Anomalie im Verhalten des Blutserums bei Syphilis neue Wege angebahnt. Zugleich mußte aber die Feststellung der Alkohollöslichkeit einen wesentlichen Fortschritt für die

Technik und Methodik der Syphilisreaktion bedeuten, da durch die Verwendung der alkoholischen Organextrakte ein brauchbarer Ersatz für die wässerigen gegeben war, welcher die wesentlichen Nachteile der letzteren — die leichte Veränderlichkeit und mangelhafte Haltbarkeit — vermied. Obgleich man nach den fast allgemein übereinstimmenden Angaben der Autoren heute wohl annehmen darf, daß die Verwendung eines alkoholischen Organextraktes als Stammlösung einen vollwertigen Ersatz für die ursprünglich benutzten Auszüge in physiologischer Kochsalzlösung darstellt, so erscheint die Frage, mit welchen Stoffen das Blutserum der Syphilitiker reagiert, nicht nur in theoretischer, sondern auch ganz besonders in praktischer Hinsicht nach wie vor bedeutungsvoll.

Zwar ist die Schwierigkeit der Beschaffung von Material, wenn man normale Organe, und vielleicht sogar tierische für die Herstellung der Extrakte wählt, behoben. Andererseits wird man der autoritativen Forderung Wassermanns, nur syphilitische Organe zu verwenden, immerhin Beachtung zu schenken haben, zumal bereits das unterschiedliche Verhalten der wässerigen Extrakte darauf hindeuten scheint, daß in den syphilitischen Organen eine für das Zustandekommen der Reaktion besonders günstige Form des Gehaltes oder der Speicherung von Lipoiden besteht. In jedem Falle ist aber ein Mißstand auch bei Verwendung alkoholischer Organextrakte darin zu suchen, daß sie in Zusammensetzung und Wirkung in weiten Grenzen variieren, wie sich dies aus zahlreichen Angaben der Literatur, sowie auch aus unseren eigenen Erfahrungen zur Genüge ergibt. Der Wunsch nach einer in konstanter Weise zu rekonstruierenden Lipoidlösung für die Anstellung der Wassermannschen Reaktion dürfte daher allgemein als ein fühlbarer empfunden werden, und die von uns letztthin erhobenen Befunde, über die wir in einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> berichtet haben, tragen auch dazu bei, die Bedeutung der Differenzen

---

1) H. Sachs und P. Rondoni, Beiträge zur Theorie und Praxis der Wassermannschen Syphilisreaktion. I. Mitteilung. Ueber den Einfluß der Extraktverdünnung auf die Reaktion. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 44.

in der Beschaffenheit verschiedener Organextrakte zu erhöhen. Wir hatten nämlich gefunden, daß bereits die Art der Verdünnung für die Wirkung eines und desselben Extraktes einen erheblichen Ausschlag bedingen kann. Setzt man zu der gemessenen Menge des alkoholischen Extraktes die zur 4- bis 6-fachen Verdünnung erforderliche Quantität physiologischer Kochsalzlösung „fraktioniert“ unter ständigem Schütteln in das Gemischtes zu, so resultiert eine weit mehr dicht-milchig trübte Emulsion, als bei raschem Mischen der gleichen Mengen von Extrakt und Kochsalzlösung. Die fraktioniert hergestellten Verdünnungen bewirken eine oft sehr erhebliche Verstärkung der Reaktion, können aber unter Umständen dadurch, daß sie bereits an und für sich antikomplementär wirken, für die Praxis ungeeignet werden. Da die einzelnen Extrakte auch in bezug auf dieses Verdünnungsphänomen variieren, so ergibt sich wiederum die Notwendigkeit, für die verschiedenen Extrakte die optimale Art der Verdünnung zu erproben. Mußten uns diese Beobachtungen einen Ersatz des Organextraktes um so wünschenswerter erscheinen lassen, so galt es uns andererseits wichtige Hinweise für das weitere Vorgehen in dieser Richtung.

Es sind ja bereits von den verschiedensten Seiten eine Reihe von Stoffen angegeben worden, welche bis zu einem gewissen Grade den Organextrakt bei der Syphilisreaktion ersetzen können. Zuerst wurde von Wassermann<sup>1)</sup>, Porges und Meier<sup>2)</sup> das Lecithin erwähnt, später wurden von Levaditi und Yamanouchi<sup>3)</sup> den gallensauren Salzen, von Fleischmann<sup>4)</sup> dem Cholestearin und Vaseline, von Sac

1) A. Wassermann, Ueber die Entwicklung und den gegenwärtigen Stand der Serodiagnostik gegenüber Syphilis. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 51.

2) O. Porges und G. Meier, Ueber die Rolle der Lipide der Wassermannschen Syphilisreaktion. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 15.

3) C. Levaditi et T. Yamanouchi, Le séro-diagnostic de syphilis. C. r. de la Soc. de Biol., T. 63, 1907, No. 38.

4) Fleischmann, Zur Theorie und Praxis der Serumdiagnose Syphilis. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 10.



und Altmann<sup>1)</sup> den Seifen, insbesondere dem oleinsauren Natron derartige Funktionen zugeschrieben. Für die Praxis hat man jedoch bisher von der Verwendung dieser Stoffe Abstand genommen, und mit Recht. Denn aus den allgemeinen Erfahrungen hat sich ergeben, daß die Unterschiede im Verhalten des Serums von Syphilitikern bei Benutzung dieser Chemikalien durchaus nicht so ausgesprochen sind, wie beim Gebrauch der natürlichen Organextrakte. Einmal sind die Hemmungen der Hämolyse oft nur bei zeitlicher Beobachtung wahrzunehmen, indem nachträglich auch bei positiver Reaktion noch eine mehr oder weniger starke Lösung eintritt. Dann aber hängt die Brauchbarkeit meist von der Benutzung eng limitierter Dosen der Stoffe ab, die je nach den Umständen der einzelnen Versuche in gewissen Grenzen variieren können. Die besten Resultate sahen wir selbst bei Verwendung des von dem einen von uns in Gemeinschaft mit Altmann angegebenen oleinsauren Natrons eintreten; über Cholestearin und Vaseline fehlen uns allerdings eigene Erfahrungen. Daß den Seifen eine wesentliche Bedeutung für das Zustandekommen der Wassermannschen Reaktion zukommt, dafür würden auch die von Beneke<sup>2)</sup> auf Grund histologischer Untersuchungen festgestellten Befunde sprechen, nach denen gerade den Lebern syphilitischer Neugeborener ein besonders hoher Seifengehalt zuzusprechen ist.

Jedenfalls gingen wir bei unseren weiteren Untersuchungen von den durch Sachs und Altmann ermittelten Tatsachen aus. Der von diesen Autoren benutzte Verwendung von Lösungen des oleinsauren Natrons in physiologischer Kochsalzlösung stehen aber folgende Nachteile gegenüber, um deren Beseitigung es sich für uns an erster Stelle handeln mußte:

1) Die Seifenlösung ist nur in ganz bestimmter Menge zur Reaktion brauchbar, indem bei einem ziemlich geringen

---

1) H. Sachs und K. Altmann, Ueber die Wirkung des oleinsauren Natrons bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 10.

2) R. Beneke, Zur Wassermannschen Syphilisreaktion. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 15.

Ueberschuß bereits die hämolytische Wirkung der Seifen Erscheinung tritt.

2) Die für die Reaktion geeigneten Dosen der Seifenlösung sind solche, welche an und für sich und selbst n Zusatz des komplettierenden Meerschweinchenserums hämolytisch wirken. Sie würden daher nach weiterem Zusatz menschlichen Serums, das die hämolytische Wirkung der Seife aufhebt, antikomplementär wirken, wenn nicht gleichzeitig dem Zufügen des menschlichen Serums und bei der üblichen Verwendung von Hammelblut der Ambozeptorgehalt in einer reichender Weise vermehrt würde.

Aus den geschilderten Nachteilen der Seifenlösung ergibt sich zugleich die Forderungen, die man an einen brauchbaren Ersatz der Organextrakte stellen muß. Die als Reagenzien dienende Lösung darf in den zur Reaktion benutzten Mengen im Verein mit Meerschweinchenserum nicht hämolytisch wirken und darf ebensowenig eine antikomplementäre Wirkung gegenüber dem hämolytischen System ohne Zusatz des menschlichen Serums entfalten<sup>1)</sup>. Nicht ganz so wichtig, aber immer

---

1) Wir halten es für angezeigt, auch an dieser Stelle auf die Quellen hinzuweisen, welche auch bei Verwendung natürlicher Organextrakte durch ihre hämolytische Wirkung entstehen können. Die hiesigen Institut geübte Methodik schützt vor derartigen Täuschungen, dies bereits F. Höhne (Berl. klin. Woch., 1908, No. 38) ausgeführt. Da nämlich die hämolytische Kraft der Organextrakte weitgehend variabel ist, darf man sich nicht damit begnügen, den Extrakt auf antikomplementäre Wirkung zu kontrollieren. Man muß vielmehr vor der Verwendung eines neuen Extraktes einen Versuch in der Weise ausführen, daß man steigende Mengen des Extraktes mit Meerschweinchenserum und Hammelblut unter Fortlassen des Ambozeptors digeriert. Es sind dann nur diejenigen Mengen für die Anstellung der Reaktion zu verwenden, welche hämolytischen Wirkung entbehren. Leider vermißt man in vielen Arbeiten nähere Angaben, welche eine Beurteilung in dieser Hinsicht ermöglichen. Wirkt der Extrakt aber hämolytisch, so übt er in entsprechender Menge auch eine antikomplementäre Wirkung aus. Daß trotzdem die Kontrolle mit nichtsyphilitischem Menschenserum im Gegensatz zum Verhalten Syphilitikersera komplette Hämolyse aufweisen, wird durch den Ambozeptorgehalt des menschlichen Serums veranlaßt. Ist letzterer aber gelegentlich gering oder fehlt er ganz, so kann unter diesen Umständen eine positive

erstrebenswert ist es, daß die Lösung auch in der doppelten Menge der zur Reaktion dienenden Dosis die Hämolyse des Hammelbluts durch den Immunambozeptor und Meerschweinchenserum als Komplement unbeeinflusst läßt.

Wir verwendeten wiederum, wie bereits früher Sachs und Altmann, das oleinsäure Natrium von Kahlbaum, stellten aber von vornherein, um haltbare Stammlösungen zu erhalten, alkoholische Lösungen her. Um oleinsaures Natrium in Alkohol zu lösen, bedarf es eines kleinen Umweges. Man erhält klare 1-proz. Lösungen, wenn man die Seife erst 20-proz. in Wasser verreibt und dann mit so viel Alkohol aufnimmt, daß eine 1-proz. Lösung resultiert. Derartige 1-proz. alkoholische Lösungen, auf deren Herstellung wir an späterer Stelle zurückkommen, dienten uns als Ausgang für die weiteren Versuche.

Es war unser Bestreben, die hämolytische Wirkung der Seife aufzuheben oder zu vermindern, ohne dabei ihre Fähigkeit mit dem Serum, von Syphilitikern zu réagieren, abzuschwächen. Nach einer Reihe von orientierenden Vorversuchen glaubten wir, die geeignete Substanz gefunden zu haben in dem Lecithin, das einerseits die Seifenhämolyse hemmt, andererseits, wie wir durch die Untersuchungen Wassermanns, Porges und Meiers wissen, sich an und für sich für die Syphilisreaktion eignet. Daß Lecithin, mit Seife vermischt, einen stark hemmenden Einfluß auf die Seifenhämolyse ausübt, hat bereits F. Sachs<sup>1)</sup> für das Präparat „Lecithol“ der Firma Riedel festgestellt. Wir selbst haben zwei Leci-

---

Reaktion vorgetäuscht werden. Es wäre denkbar, und einige eigene Erfahrungen bestärken uns in dieser Vermutung, daß gerade bei menschlichen Seris im juvenilen Alter öfter nur ein geringer Ambozeptorgehalt aufzufinden ist, zumal ja feststeht, daß im fötalen Serum gewisse Ambozeptoren, über welche das Serum Erwachsener verfügt, fehlen. Ob derartige Verhältnisse bei den von einigen Autoren beschriebenen positiven Ergebnissen der Wassermannschen Reaktion bei Scharlach eine Rolle spielen, müssen wir dahingestellt sein lassen, da im hiesigen Institut niemals ein positiver Ausfall bei Scharlach beobachtet wurde.

1) F. Sachs, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Seifenhämolyse. Biochemische Zeitschr., Bd. 12, 1908, S. 278.

thinpräparate, das Lecithin-Agfa und das Lecithin-Merck daraufhin untersucht. Beide wirken unverkennbar hemmend auf die Seifenhämolyse. Die hemmende Wirkung ist bei zeitlicher Beobachtung nach 1—2 Stunden sehr eklatant, erheblich ausgesprochener bei Verwendung des Merckschen Präparates, als beim „Agfa“-Lecithin. Ersteres unterscheidet sich auch dadurch, daß es an und für sich weit weniger stark hämolytisch wirkt, als das „Agfa“-Lecithin, und daß seine hemmende Wirkung gegenüber der Seifenhämolyse bei geeigneten Mischungsverhältnissen dauernd bestehen bleibt. Wir haben daher für unsere weiteren Untersuchungen lediglich das Mercksche Lecithinpräparat verwandt, und zwar in Stammlösungen, welche in 98-proz. Alkohol hergestellt waren.

Die Erwartungen, welche wir an eine Kombination von Seife und Lecithin knüpften, wurden nun noch insofern übertroffen, als es sich zeigte, daß die Seife durch den Lecithinzusatz nicht nur in ihrer hämolytischen Wirkung abgeschwächt wurde, sondern gleichzeitig einerseits weniger antikomplementär wirkte, andererseits sich aber bereits in geringeren Dosen für die Syphilisreaktion geeignet erwies. Zur Illustration dieser wichtigen Tatsachen lassen wir aus unseren zahlreichen Protokollen einige Beispiele folgen.

Wir verfahren, um bei den umfassenden Versuchsreihen, welche wir ausführen mußten, an Material zu sparen, meist in der Weise, daß wir nur die Hälfte derjenigen Mengen, welche in der Regel bei der Ausführung der Wassermannschen Reaktion benutzt werden, verwendeten. Der Typus unserer Versuchsordnung ist demnach folgender:

A. Für die Ermittlung der antikomplementären Wirkung der Lipoidlösung: absteigende Mengen der Lösung (Volumen = 1,0 ccm) + 0,5 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums — 1 $\frac{1}{4}$ -ständiger Aufenthalt bei 37° — Zusatz von 0,5 ccm der geeigneten Ambozeptorverdünnung + 0,5 ccm Hammelblutaufschwemmung.

B. Für die eigentliche Syphilisreaktion: absteigende Mengen der Lipoidlösung (Volumen = 0,5 ccm) + 0,5 ccm des 10-fach verdünnten inaktivierten Patientenserums + 0,5 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums — 1 $\frac{1}{4}$ -ständiger Aufenthalt bei 37° — Zusatz

von 0,5 ccm der Ambozeptorverdünnung + 0,5 ccm Hammelblutaufschwemmung<sup>1)</sup>.

Folgender Versuch demonstriert die antikomplementäre Wirkung der Seife, des Lecithins und eines Gemisches beider Substanzen. Die benutzten Lösungen waren:

- I. 1 Teil 1-proz. oleinsaures Natrium + 1 Teil Alkohol.
- II. 1 Teil 1-proz. Lecithin + 1 Teil Alkohol.
- III. 1 Teil 1-proz. oleinsaures Natrium + 1 Teil 1-proz. Lecithin.

Die 3 Lösungen wurden 6-fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Absteigende Mengen dieser Verdünnungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,0 ccm aufgefüllt und mit je 0,5 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums  $1\frac{1}{4}$  Stunden bei 37° digeriert. Sodann erfolgte Zusatz von je 0,5 ccm Ambozeptorverdünnung (3—4 Einheiten) und 0,5 ccm Hammelblutaufschwemmung. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1.

Mengen der Lipoidlösung (6-fach verdünnt) ccm	Hemmung der Hämolyse durch		
	I. Seife	II. Lecithin	III. Seife + Lecithin
0,8	wenig	fast komplett	0
0,65	0	komplett	komplett
0,5	0	"	"
0,3	stark	"	"
0,2	fast komplett	"	"
0	komplett	"	"

Die Tabelle zeigt, daß die antikomplementäre Wirkung der Seife durch den Lecithinzusatz ganz erheblich abgeschwächt wird. Aus den ersten Gliedern der Reihen I und III ergibt sich gleichzeitig der hemmende Einfluß des Lecithins auf die Seifenhämolyse. Von besonderem Interesse ist aber die Tatsache, daß das Lecithin die Fähigkeit der Seife, mit Syphilitikerserum zu reagieren, ganz erheblich verstärkt. Das wird durch folgendes Versuchsbeispiel illustriert:

1) Wir verfahren auch in der Praxis seit längerer Zeit in der hier geschilderten Art. Die Anordnung hat den Vorteil, daß eine wesentliche Ersparnis an Meerschweinchenserum resultiert und man mit 0,35 ccm des Patientenserums ausreicht, ohne daß die Reaktion irgendwie an Exaktheit verliert.

Es wurden folgende Gemische verwendet:

- I. 2 Teile 1-proz. oleinsaures Natrium + 1 Teil Alkohol.
- II. 1 Teil 2-proz. Lecithin + 2 Teile Alkohol.
- III. 2 Teile 1-proz. oleinsaures Natrium + 1 Teil 2-proz. Lecithin

Mit diesen 3 Mischungen wurden 2 Versuche ausgeführt und :

- a) mit einem positiv reagierenden menschlichen Serum,
- b) mit einem negativ reagierenden menschlichen Serum.

Absteigende Mengen der 3 Lipoidlösungen (4-fach verdünnt) w mit je 0,5 ccm des 10-fach verdünnten Patientenserums und je 0,5 des 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums  $1\frac{1}{4}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  dig worauf Zusatz von Blut + Ambozeptor erfolgte. Das Resultat Tabelle 2a und b.

Tabelle 2a.

Mengen der der Lipoidlösung (4-fach verdünnt)  ccm	Eingetretene Hämolyse bei der Syphilisreaktio		
	Positiv reagierendes Serum		
	I. Seife	II. Lecithin	III. Seife + Leci
0,5	komplett	} komplett	komplett
0,35	0		0
0,25	komplett		0
0,15	"		0
0,1	"		0
0	"		komplett

Tabelle 2b.

Lipoidlösung (4-fach verdünnt)  ccm	Eingetretene Hämolyse bei der Syphilisreaktio		
	Negativ reagierendes Serum		
	I. Seife	II. Licithin	III. Seife + Leci
0,5	} komplett	} komplett	komplett
0,35			stark
0,25			komplett
0,15			"
0,1			"
0			"

Aus der Tabelle 2a ergibt sich die erhebli Verstärkung der Seifenwirkung durch Lecit bei der Syphilisreaktion. Mit Lecithin allein h wir nur ziemlich geringfügige Unterschiede im Verhalten

Sera von Syphilitikern und Nichtsyphilitikern wahrgenommen. Die hemmende Zone lag dabei oberhalb der in den obigen Tabellen notierten Dosen. Es handelt sich also bei dem Zusammenwirken von Seife und Lecithin nicht etwa um eine Summation, sondern wohl sicherlich um die kombinierte Wirkung zweier Stoffe, deren Wesen wir freilich dahingestellt lassen müssen. Für den Einfluß der Wirkung des Lecithins auf die Seife ist auch der folgende Versuch charakteristisch.

Es wurden 2 Reihen angesetzt:

In Reihe A wurden absteigende Mengen der 8-fachen Verdünnung einer 1-proz. Lecithinlösung mit gleichen Mengen eines positiv reagierenden Syphilitiker-serums gemischt und im übrigen wie bei der Syphilisreaktion verfahren.

In Reihe B wurde den absteigenden Lecithinmengen noch eine gleich bleibende Menge Seifenlösung zugesetzt, welche unterhalb der bei der Syphilisreaktion wirksamen lag. Die Anordnung war im übrigen identisch mit derjenigen in Reihe A.

In diesem Versuch gelangten 0,1 ccm Meerschweinchenserum, 0,1 ccm Menschenserum und 1 ccm der Hammelblutaufschwemmung zur Verwendung; das Gesamtvolumen betrug 4 ccm, vor dem Zusatz von Blut und Ambozeptor 2,5 ccm. Das Ergebnis ist aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 3.

Lecithin  ccm	Eingetretene Hämolyse bei der Syphilisreaktion.	
	Absteigende Mengen Lecithin und gleich bleibende Mengen Syphiliserum.	
	A. Lecithin allein	B. Zusatz von Seife
1,0	komplett	0
0,75		0
0,5		0
0,4		0
0,3		0
0,25		0
0,2		0
0,15		0
0,1		Spur
0		komplett

Es ergibt sich also, daß selbst das 10-fache Multiplum derjenigen Lecithinmenge, welche dazu ausreicht, im Verein

mit einer unwirksamen Seifendosis zu reagieren, an und sich für die Komplementbindungsreaktion ungeeignet ist.

Es handelte sich nun für uns, zu erproben, welche Kombination von Seife und Lecithin sich am besten für die Wassermannsche Syphilisreaktion eignet. Nach mannigfachen Variationen haben wir uns schließlich für Gemische entschieden, welche gleiche Gewichtsteile Lecithin und oleinsaures Natrium enthalten. Sowohl ein Ueberschuß, als auch ein geringer Gehalt an Lecithin schwächt nach unseren Erfahrungen die Wirksamkeit der Gemische ab.

Bei der Ermittlung der vorteilhaften Konzentration und absoluten Mengen boten sich aber einige Schwierigkeiten dar. In der erwähnten früheren Mitteilung haben wir bereits die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, „daß für das Zustandekommen der Wassermannschen Reaktion nicht allein die chemische Beschaffenheit der Organextrakte und ihr Gehalt an reaktionsfähigen Stoffen, sondern in gleichem Maße die Art ihres Lösungszustandes von Bedeutung ist“. Der Einfluß der raschen oder fraktionierten Verdünnung haben wir auch bei unseren künstlichen alkoholischen Lipoidlösungen ohne weiteres demonstrieren können. Aber auch bei gleichmäßig fraktionierter Verdünnung, die wir bei den Versuchen mit künstlichen Gemischen stets übten, zeigten sich Differenzen für welche der Alkoholgehalt verantwortlich zu machen war. Wir erwähnen das folgende Beispiel:

Aus einer alkoholischen Stammlösung, welche je 0,5 Proz. Lecithin und oleinsaures Natrium enthielt, wurden 20-fache Verdünnungen auf folgende Arten bereitet:

- a) 1 Teil Stammlösung + 4 Teile Alkohol + 15 Teile physiologische Kochsalzlösung.
- b) 1 Teil Stammlösung + 3 Teile Alkohol + 16 Teile physiologische Kochsalzlösung.
- c) 1 Teil Stammlösung + 2 Teile Alkohol + 17 Teile physiologische Kochsalzlösung.

Mit diesen 3 Verdünnungen wurde die Syphilisreaktion gegen ein positiv reagierendes Serum ausgeführt (absteigende Mengen Verdünnungen [a—c] +  $\frac{1}{10}$  · 0,5 ccm Menschenserum +  $\frac{1}{10}$  · 0,5 ccm Meerschweinchenserum —  $1\frac{1}{4}$  Stunden 37° — 0,5 ccm Ambozeptorverdünnung + 0,5 ccm Hammelblutaufschwemmung).

Das Resultat ist in Tabelle 4 notiert.



Tabelle 4.

Mengen der je 0,025 Proz. Seife und Lecithin enthaltenden Verdünnung ccm	Eingetretene Hämolyse bei der Syphilisreaktion unter Benutzung eines positiv reagierenden Serums.		
	Die Verdünnung des Lipoidgemisches enthielt:		
	a) 25 Proz. Alkohol	b) 20 Proz. Alkohol	c) 15 Proz. Alkohol
0,4	0	0	wenig
0,25	0	mäßig	komplett
0,125	mäßig	komplett	"
0,075	fast komplett	"	"
0	komplett	"	"

Es zeigt sich in der Tabelle, daß gleiche Mengen des Seife-Lecithin-Gemisches verschieden stark mit Syphilitiker-serum reagieren, je nachdem der Alkoholgehalt in ziemlich geringer Breite variiert. Alkohol verstärkt also die Reaktionsfähigkeit der Lipoide, und man muß an die Möglichkeit denken, daß dieser Umstand für die Erklärung von Befunden, nach welchen sich alkoholische Extrakte aus normalen Organen besser für die Syphilisreaktion eignen als wässerige, von Bedeutung ist. Für die Bereitung einer alkoholischen Stammlösung würde sich nun die Forderung ergeben, eine möglichst geringe Konzentration zu wählen, damit die Lösung zum Versuch nicht zu stark mit Kochsalzlösung verdünnt zu werden braucht. Dem steht aber im Wege, daß bei derart schwach verdünnten alkoholischen Lösungen der Einfluß des Alkohols sich in den Kontrollen, welche die antikomplementäre Wirkung der Lipoidlösung betreffen, unangenehm bemerkbar macht. Obwohl der Alkohol an und für sich in den zur Verwendung gelangenden Mengen indifferent ist, so verstärkt er nämlich die antikomplementäre Funktion und gleichzeitig die hämolytische Wirkung der Lipoidlösungen. Die Verstärkung der Hämolyse durch die Kombination von Alkohol und Lipoiden steht übrigens in Analogie zu dem von Arrhenius<sup>1)</sup> mitgeteilten Befund, daß die hämolytische

1) S. Arrhenius, Versuche über Hämolyse. Meddelanden fran K. Vetenskaps-Academiens Nobelinstitut. Bd. I, No. 10, 1908.

Wirkung des Trioleins durch Alkohole bedeutend erhöht wird. Durch diesen Umstand kann man der Forderung, daß das Lipoidgemisch ohne Zusatz von Patientenserum auch in der doppelten Menge der bei der eigentlichen Syphilisreaktion benutzten Dosis nicht antikomplementär wirken soll, bei schwacher Verdünnung der alkoholischen Stammlösung nicht genügen, wenn man nicht mit den Mengen der Verdünnungen hinreichend heruntergeht. Unter diesen Umständen empfiehlt es sich mehr, von vornherein stärkere Verdünnungen der alkoholischen Stammlösung herzustellen und die Konzentration der letzteren so zu wählen, daß sie den sich ergebenden Anforderungen entspricht. Durch die beschriebene Kombination von gleichen Teilen Lecithin und Seife ist es uns leicht gelungen, alkoholische Lösungen zu erhalten, die mit stark reagierendem Syphilisserum prompt die Reaktion gaben. Mit weniger stark, aber mit natürlichem Organextrakt prompt reagierenden Seris war die Reaktion jedoch ziemlich schwach oder blieb nicht ganz selten aus. Niemals jedoch haben wir eine positive Reaktion unter Benutzung unserer Seife-Lecithingemische bei Verwendung der Sera von Nichtsyphilitikern eintreten sehen.

In zahlreichen tastenden Versuchen mußten wir uns nunmehr bemühen, die künstlichen Gemische in geeigneter Weise zu verstärken. Es ist uns gelungen, in der Oelsäure einen Stoff aufzufinden, der unser Ziel, wenn auch nicht vollkommen, so doch, wie wir glauben, in genügender Weise erreichen ließ. Die Oelsäure verstärkt die hämolytische Wirkung der Seife-Lecithin-Gemische und ebenso ihre antikomplementäre Wirkung. Der zulässige Oelsäurezusatz mußte daher erst vorsichtig ermittelt werden, und es zeigte sich, daß man in gewissen Grenzen um so mehr Oelsäure zusetzen kann, je geringer Seife und Lecithin in der alkoholischen Stammlösung konzentriert sind.

Wir benutzten die Oleinsäure „Kahlbaum“ und gelangten schließlich zu den in Tabelle 5 notierten Rezepten, die nach unseren bisherigen Erfahrungen — untereinander ziemlich gleich-

wertig — einen brauchbaren Ersatz für die natürlichen alkoholischen Organextrakte darstellen.

Tabelle 5.

Künstliches Gemisch A		Künstliches Gemisch B	
Oleinsaures Natrium:	2,5	Oleinsaures Natrium:	1,0
Lecithin:	2,5	Lecithin:	1,0
Oleinsäure:	0,75	Oleinsäure:	1,5
Aq. destill.:	12,5	Aq. destill.:	5,0
Alkohol	ad 1000,0	Alkohol	ad 1000,0

Die Bereitung der beiden Gemische, bei welcher scheinbar geringfügige Abweichungen vielleicht nicht gleichgültig sind, müssen wir etwas eingehender schildern. Da wir ferner nicht wissen, ob die gleichen Präparate anderer Firmen sich ebenso gut eignen, geben wir nochmals ausdrücklich die von uns benutzten Präparate an:

Oleinsaures Natrium: Kahlbaum - Berlin.

Lecithin (ovo): Merck - Darmstadt,

Oleinsäure (Marke „Kahlbaum“): Kahlbaum - Berlin.

Als Ausgangslösungen dienen 1-proz. Lösungen von Lecithin und oleinsaurem Natrium in Alkohol. Die letztere muß, wie schon erwähnt, in folgender Weise bereitet werden: Die abgewogene Seifenmenge wird zunächst trocken in der Reibschale zerrieben, sodann mit destilliertem Wasser (5 ccm auf 1 g) unter allmählichem Zusatz des letzteren zu einer möglichst gleichmäßigen (20-proz.) Emulsion sorgfältig gerührt. Darauf wird die Emulsion mit so viel Alkohol aufgenommen, daß eine 1-proz. Seifenlösung resultiert (1 Seife + 5 Wasser + 95 Alkohol). Lecithin- und Seifenlösung werden nunmehr zu gleichen Teilen gemischt, die Mischung durch ein gehärtetes Papierfilter filtriert. Das Filtrat muß absolut klar sein.

Zur Herstellung des Gemisches A bereiten wir je 300 ccm 1-proz. Lecithin und 1-proz. oleinsaures Natrium in Alkohol. Die Mischung beider Lösungen wird filtriert. Von dem Filtrat werden 500 ccm abgemessen und mit 500 ccm Alkohol gemischt. In diese Lösung werden 0,75 ccm Olein-

säure mittels Pipette eingeblasen (genau abmessen, Pipette mehrmals durchspülen!), so daß der Oelsäuregehalt 0,75 ‰ beträgt.

Für die Bereitung des Gemisches B werden je 150 ccm 1-proz. Lecithin und 1-proz. oleinsaures Natrium in Alkohol bereitet. Von dem Filtrat der Mischung werden 200 ccm mit 800 ccm Alkohol verdünnt. Der resultierenden Lösung werden 1,5 ccm Oleinsäure in der beschriebenen Weise zugesetzt, so daß die Konzentration der letzteren 1,5 ‰ beträgt.

Die derart hergestellten endgültigen Stammlösungen halten sich nach bisheriger Erfahrung bei Aufbewahrung im Eisschrank — wohl auch bei Zimmertemperatur — gut, scheinen sogar bei längerem Lagern an Brauchbarkeit zu gewinnen<sup>1)</sup>.

Zur Anstellung der Syphilisreaktion benutzen wir 5-fache Verdünnungen der Gemische in physiologischer Kochsalzlösung. Dieselben werden fraktioniert in folgender Weise hergestellt: In eine Flasche werden etwa 2 ccm der alkoholischen Stammlösung eingefüllt. Zu diesen werden aus einer Pipette langsam 8 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung zugefügt, so daß die Kochsalzlösung tropfenweise zufließt; die Flasche wird dabei ständig geschüttelt. Die Verdünnungsflüssigkeit ist dabei mäßig stark getrübt, muß aber homogen bleiben und darf nicht ausfallen.

Welches von den beiden Gemischen das geeignetere ist, können wir noch nicht mit Sicherheit angeben. Unsere Erfahrungen beziehen sich im wesentlichen auf das Gemisch A, und wir müssen daher dieses an erster Stelle empfehlen, können aber hinzufügen, daß uns in neueren Versuchen, die uns noch nicht zahlreich genug sind, das Gemisch B einige Ueberlegenheit aufzuweisen schien<sup>2)</sup>. Unsere bisherigen Versuche können wir dahin resumieren, daß wir bei Ver-

---

1) Wir sind gern bereit, diese Gemische zur Verfügung zu stellen.

2) Anmerkung während der Korrektur: Nach weiteren Erfahrungen scheint für das Gemisch B die gewöhnliche, ziemlich rasche Art der Verdünnung zweckmäßig zu sein.

wendung der künstlichen Gemische niemals mit dem Blutserum von Nichtsyphilitikern eine positive Reaktion wahrgenommen haben. Dagegen reagierten die künstlichen Gemische bisher mit allen Seris, die bei Verwendung von natürlichem Organextrakt als positiv erkannt waren, gleichfalls positiv. Nur war bei manchen dieser Sera ein quantitativer Unterschied in der Stärke der Reaktion zugunsten der natürlichen Extrakte vorhanden. Es ist uns vorläufig nicht gelungen, eine weitere Verstärkung der künstlichen Gemische zu erzielen, ohne die Beweiskraft der erforderlichen Kontrollen herabzusetzen. In Anbetracht des Umstandes, daß der von uns gegenwärtig benutzte und zur Kontrolle der natürlichen Gemische herangezogene Organextrakt ein besonders stark wirkender ist, glauben wir aber, die Erfolge mit unseren künstlichen Gemischen bereits jetzt als recht befriedigende bezeichnen zu dürfen. Natürlich verhehlen wir uns nicht, daß für den etwaigen Eingang der Gemische in die Praxis eine umfassende vergleichende Prüfung erforderlich ist, und im hiesigen Institute sind derartige Untersuchungen im Gange.

Wir lassen einige Versuchsprotokolle zum Vergleich der künstlichen Gemische mit dem natürlichen Organextrakt (aus syphilitischer Leber gewonnen) folgen: der benutzte Organextrakt gelangt in 6-facher Verdünnung zur Anwendung. Unsere Anordnung ist folgende:

Der Hauptversuch besteht aus 4 Röhrchen, welche folgende Mengen der Verdünnungen enthalten:

- |            |             |
|------------|-------------|
| 1) 0,4 ccm | 3) 0,15 ccm |
| 2) 0,25 „  | 4) 0 „      |

Mit physiologischer Kochsalzlösung wird gleiches Volumen = 0,5 ccm hergestellt. Dazu kommen je 0,5 ccm des 10-fach verdünnten Patientenserums und je 0,5 ccm des 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums. Nach 1 $\frac{1}{4}$ -stündigem Aufenthalt bei 37° erfolgt Zusatz von je 0,5 ccm der Ambozeptorverdünnung (3—4 lösende Dosen) und je 0,5 ccm der Hammelblutaufschwemmung (5—7-proz.).

Die Kontrolle der Lipoidlösung wird in der Weise ausgeführt, daß die Verdünnung in den Mengen von 0,8—0,65—0,5—0,3 ccm (auf 1 ccm

10\*

aufgefüllt) mit je 0,5 ccm 10-fach verdünnten Meerschweinchenserums digeriert wird.

Zur Beurteilung neuer Lipoidlösungen ist es noch erforderlich, den letzten Versuch mit der Abweichung zu wiederholen, daß an Stelle des Ambozeptors nur Kochsalzlösung zugesetzt wird.

Einige Beispiele sind aus den folgenden Tabellen (6 und 7) ersichtlich:

Tabelle 6.

6-fach ver- dünnter Organextrakt ccm	Ergebnis bei der Wassermannschen Reaktion					
	Nummer des Serums					
	1445	1474	1476	1492	1508	1512
0,4	0	0	0	0	0	} komplett
0,25	Spur	0	0	0	0	
0,15	stark	0	0	0	0	
0	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	
5-fach ver- dünntes Gemisch A. ccm						
0,4	mäßig	0	0	0	0	} komplett
0,25	stark	Spürchen	wenig	0	0	
0,15	fast kpltt.	stark	fast kpltt.	0	0	
0	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	

Tabelle 7.

## Kontrolle des Gemisches A.

5-fach verdünntes Gemisch A ccm	I. Prüfung auf antikomple- mentäre Wirkung [ohne Menschenserum]	II. Prüfung auf hämolytische Wirkung im Verein mit Meerschweinchenserum [ohne Ambozeptor]
0,8	mäßig	0
0,65	komplett	0
0,5	"	0
0,3	"	0
0	"	0

Für die Tabelle 6 haben wir absichtlich 3 solche Sera ausgewählt, welche mit dem künstlichen Gemisch schwächer

reagierten, als mit dem natürlichen Organextrakt. Immerhin ist die Reaktion noch deutlich wahrzunehmen. Begnügt man sich mit der zeitlichen Beobachtung des Eintrittes der Hämolyse, so ist die Reaktion erheblich stärker. Wir haben aber besonderen Wert darauf gelegt, die Ergebnisse erst am nächsten Tage abzulesen, wie wir in der Praxis frühestens nach zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank ein positives Urteil abgeben. Bei Berücksichtigung der temporären Verhältnisse spielt doch der variierende Gehalt des menschlichen Serums an Ambozeptoren oft eine interferierende Rolle.

Aus Tabelle 7, I ergibt sich, daß das Gemisch in der doppelten Menge der größten zur eigentlichen Reaktion dienenden Dosis etwas antikomplementär wirkt. Wir glauben, daß man der Forderung, daß die Hemmung auch hierbei ausbleibt, nicht strikt Rechnung tragen muß, da ja durch den Zusatz des menschlichen Serums in der überwiegenden Mehrheit der Fälle eine erhebliche Verstärkung der hämolytischen Wirkung statt hat. Immerhin glaubten wir daran festhalten zu sollen, daß wenigstens ein Ueberschuß der Lipoidlösung nicht antikomplementär wirkt. Verzichtet man auf diese Vorsicht, so kann man leicht stärkere Gemische herstellen oder die genannten durch nur 4-fache Verdünnung in ihrer Wirksamkeit erhöhen, so daß sie auch stark wirkenden natürlichen Extrakten nicht nachstehen dürften. Wir haben bei solchem Vorgehen in bezug auf negative Reaktionen die gleiche Uebereinstimmung mit den natürlichen Extrakten gefunden. Durch einen geringen oder fehlenden Ambozeptorvorrat des menschlichen Serums könnten aber dabei Irrtümer entstehen. Bei zeitlicher Beobachtung der Hämolyse wird man vor Täuschungen gewarnt werden können, da die nur menschliches Serum ohne Lipoidlösung enthaltenden Kontrollen in solchen Fällen längere Zeit ungelöst bleiben.

In diesem Sinne halten wir überhaupt die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Hämolyse für erwünscht. Es genügt dabei eine Kontrollierung nach einem Aufenthalt von etwa 30—40 Minuten bei 37°. Die nur menschliches Serum enthaltenden Röhrchen sind dann meist vollständig oder stark gelöst. Wenn zu dieser Zeit gelegentlich Serumproben noch ungelöst sind, so weist das auf einen ungewöhnlich niedrigen Ambozeptorgehalt hin und

mahnt zur Vorsicht bei Abgabe eines positiven Urteils. Andererseits ermöglicht die zeitliche Beobachtung oft sehr rasch das Erkennen der negativen Reaktion, indem ein Unterschied zwischen den Röhrchen mit und ohne Zusatz der Lipoidlösung nicht oder nur angedeutet vorhanden ist. Beim Fehlen eines solchen Unterschiedes zu einer Zeit, zu welcher die Kontrolle ohne Extraktzusatz noch nicht vollständig gelöst ist, kann man zudem die Möglichkeit, daß eine geringe Reaktionsfähigkeit des Serums durch einen starken Ambozeptorgehalt larviert wird, für ausgeschlossen erachten.

Jedenfalls glauben wir, daß die von uns angegebenen künstlichen Gemische mit einem Teil der natürlichen Organextrakte erfolgreich konkurrieren können, wenn auch vielleicht manche von letzteren überlegen sind. Ein umfangreicher Vergleich in der Praxis wird entscheiden müssen, ob sich unsere Lösungen dauernd bewähren, oder sich etwa noch irgendwie verstärken lassen. Gerade für die Wassermannsche Syphilisreaktion scheint uns aber der Ersatz der variierenden natürlichen Organextrakte durch ein konstantes, leicht zurekonstruierendes Reaktionsgemisch, wie es das von uns angegebene ist, im Interesse der Einheitlichkeit des Verfahrens und der Vergleichbarkeit der Resultate erwünscht zu sein.

### Zusammenfassung.

1) Lecithin vermindert gleichzeitig mit der Reduktion der hämolytischen Kraft auch die antikomplementäre Wirkung des oleinsauren Natriums.

2) Durch Kombination von Lecithin und oleinsaurem Natrium erhält man für die Wassermannsche Syphilisreaktion geeignete Lipoidlösungen.

3) Für die Wirkung dieser Lösungen ist nicht allein die absolute Lipoidmenge, sondern bis zu einem gewissen Grade auch der Alkoholgehalt von Bedeutung. Alkohol verstärkt auch die hämolytische Wirkung von Lipoiden.



4) Alkoholische Lösungen, welche in 1000 ccm

a) je 2,5 g Lecithin und oleinsaures Natrium,  
sowie 0,75 ccm Oleinsäure oder

b) je 1,0 g Lecithin und oleinsaures Natrium,  
sowie 1,5 ccm Oleinsäure enthalten,

stellen einen Ersatz der alkoholischen Organ-  
extrakte für die Wassermannsche Syphilisreak-  
tion dar. Hinsichtlich der Brauchbarkeit dieser  
Lösungen in der Praxis sind weitere Unter-  
suchungen abzuwarten.

---

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute und der  
Biologischen Versuchsanstalt in Wien.]

**Ueber ein Hämagglutinin im Samen von Datura.**

Von **M. v. Eisler** und **L. v. Portheim**.

Kobert<sup>1)</sup> und seiner Schule verdanken wir die ersten  
Beobachtungen über agglutinierende Substanzen in Pflanzen.  
Diese Stoffe wurden bei zwei Euphorbiaceen, *Croton*  
*Tiglium* und *Ricinus communis* und bei zwei Papi-  
lionaceen, *Robinia pseudacacia* und *Abrus preca-*  
*torius* nachgewiesen.

In der letzten Zeit gelang es Landsteiner und Rau-  
bitschek<sup>2)</sup>, noch in den Samen von vier Papilionaceen,  
und zwar bei *Phaseolus*, *Pisum*, *Ervum* und *Vicia*,  
hämagglutinierende Stoffe festzustellen. Diese Ergebnisse, ins-  
besondere die bei den Schmetterlingsblütlern, ließen vermuten,  
daß es leicht gelingen müsse, bei anderen Pflanzen Häm-

---

1) R. Kobert, Lehrbuch der Intoxikationen, Bd. 1, p. 161, 162;  
Bd. 2, p. 695 ff.

2) K. Landsteiner und H. Raubitschek, Beobachtungen über  
Hämolyse und Hämagglutination. Centralbl. f. Bakt., Parasitenk. und  
Infektionskrankh., I. Abt., Bd. 45, 1907, H. 7, p. 660, 664.

agglutinine aufzufinden<sup>1)</sup>. Aus der folgenden Zusammenstellung ist aber ersichtlich, daß diese Substanzen in der Pflanzenwelt nicht so stark verbreitet sind, denn bei den von uns untersuchten 99 Species und Varietäten von 56 verschiedenen Gattungen konnte der Nachweis nur bei 6 Arten einer Gattung erbracht werden.

Die zu untersuchenden Samen wurden gründlich in einer 0,85-proz. Kochsalzlösung zerrieben und der Extrakt filtriert. Dieser Auszug, welcher die Konzentration 1:100 oder 5:100 hatte, wurde zu verschiedenen, gewaschenen Blutarten zugesetzt. Von den zu untersuchenden Blutarten wurden 5-proz. Aufschwemmungen in 0,85-proz. Kochsalzlösung hergestellt.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, welche Pflanzenart und welche Blutart verwendet wurde. Nur bei den Pflanzen, bei denen sich eine Wirkung ergab, ist dies verzeichnet, bei allen anderen waren die Resultate negativ.

Bloß bei der Gattung *Datura* war Agglutination zu beobachten. Von den 17 untersuchten Arten und Varietäten dieser Gattung bei den Folgenden: *Datura ferox*, *D. gigantea*, *D. laevis*, *D. Leichhardtii*, *D. Metel*, *D. Stramonium* und *D. Wrightii*.

Es ist dies von besonderem Interesse, da sich die Gattung **Datura** von den anderen **Solanaceen** auch sonst noch deutlich unterscheidet<sup>2)</sup>.

*Datura laevis*, *D. ferox*, *D. Leichhardtii*, *D. Metel*, *D. Wrightii* und *D. Stramonium* gehören zur II. und III. der für *Datura* aufgestellten Sektionen<sup>3)</sup>, also zu den kapselfrüchtigen Datureen, während bei den Vertretern von *Datura* mit Beerenfrüchten (I. und IV. Sektion) bisher keine Agglutinine in den Samen aufgefunden werden konnten.

---

1) Landsteiner und Raubitschek, l. c. p. 666.

2) R. v. Wettstein, *Solanaceae*. A. Engler und K. Prantl, *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, IV. 3b, p. 4.

3) R. v. Wettstein, l. c. p. 27.

Pflanzenart	Extrakt	Blutart	Aufschwemmung	Wirkung
<i>Larix decidua</i>	1 : 100	Kaninchen	5 : 100	
" "	"	Ziege	"	
<i>Pinus silvestris</i>	"	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Picea excelsa</i>	"	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Abies pectinata</i>	"	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Zea mays</i>	"	Kaninchen	"	
<i>Andropogon Sorghum</i>	"	"	"	
<i>Panicum miliaceum</i>	"	"	"	
<i>Avena sativa</i>	"	"	"	
<i>Secale cereale</i>	"	"	"	
<i>Triticum vulgare</i>	"	"	"	
<i>Hordeum vulgare</i>	"	"	"	
<i>Colchicum autumnale</i>	5 : 100	"	"	
<i>Casuarina equisetifolia</i>	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Piper nigrum</i>	"	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Juglans regia</i>	"	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Cannabis sativa</i>	1 : 100	Kaninchen	"	
" "	"	Hammel	"	
<i>Urtica dioica</i>	5 : 100	Kaninchen	"	
<i>Urtica urens</i>	"	"	"	
<i>Rumex latifolius</i>	1 : 100	"	"	
" "	"	Hammel	"	
<i>Amaranthus melancholicus</i>	5 : 100	Kaninchen	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Delphinium sp.</i>	1 : 100	Kaninchen	"	
" "	"	Hammel	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Aconitum Napellus</i>	"	"	"	
" "	"	Hammel	"	
" "	"	Kaninchen	"	
<i>Myristica fragrans</i>	5 : 100	"	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Chelidonium majus</i>	"	Kaninchen	"	
<i>Papaver Rhoeas</i>	"	"	"	
<i>Papaver somniferum</i> (Gartenmohn)	"	"	"	
<i>Papaver somniferum</i> (Gartenmohn)	"	Ziege	"	
<i>Capsella Bursa pastoris</i>	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
<i>Prunus amygdalus</i>	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
<i>Leucaena glauca</i>	"	Kaninchen	"	
<i>Lupinus nanus grandifolius</i>	"	"	"	
<i>Lupinus purpur.</i>	"	"	"	
<i>Cytisus Laburnum</i>	"	"	"	

Pflanzenart	Ex- trakt	Blutart	Auf- schwem- mung	Wirkung
Caragana arborescens	5 : 100	Kaninchen	5 : 100	
Medicago sativa	"	"	"	
Lathyrus latifolius	"	"	"	
Mercurialis annua	"	"	"	
Euphorbia Cyparissias	"	"	"	
" Lathyris	"	"	"	
" palustris	1 : 100	"	"	
" variegata	"	"	"	
Hibiscus liliiflorus	5 : 100	"	"	
Eugenia caryophyllata	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
Carum carvi	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
Pimpinella anisum	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
Nicandra physaloides	1 : 100	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
" violacea	5 : 100	"	"	
Lycium Trewianum (chinense)	"	"	"	
" vulgare	"	"	"	
Atropa Belladonna	1 : 100	"	"	
" "	"	Hammel	"	
" "	"	Ziege	"	
" physaloides	5 : 100	Kaninchen	"	
Hyoscyamus niger	1 : 100	"	"	
" "	"	Hammel	"	
" "	"	Ziege	"	
Physalis Alkekengi	5 : 100	Kaninchen	"	
" capsicifolia	"	"	"	
" Franchetii	1 : 100	"	"	
" "	"	Ziege	"	
Capsicum annum	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
Solanum atropurpureum	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
" cabilense	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
" coagulans	5 : 100	"	"	
" cyananthum	"	"	"	
" Dulcamara	"	"	"	
" Hendersonii	"	"	"	
" "	1 : 100	"	"	
" "	"	Ziege	"	
" Lycopersicum	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
" Melongena	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
" nigrum	"	"	"	
" "	"	Kaninchen	"	
" robustum	"	"	"	
" "	"	Ziege	"	
" tuberosum	5 : 100	Kaninchen	"	

Pflanzenart	Ex- trakt	Blutart	Auf- schwem- mung	Wirkung
Solanum Warszewiczii	5 : 100	Kaninchen	5 : 100	
„ Weatherillei	1 : 100	„	„	
Nicotiana affinis	„	Ziege	„	
„ Tabacum	„	Kaninchen	„	
„ „	„	Hammel	„	
Datura arborea	5 : 100	Kaninchen	„	
„ „	„	Taube	„	
„ atrovioacea plenissima	1 : 100	Kaninchen	„	
„ ceratocaula	5 : 100	Taube	„	
„ „	1 : 100	Kaninchen	„	
„ coccinea	„	„	„	sofort Agglutination
„ Cornucopiae	„	„	„	„ „
„ fastuosa alba plena	„	Ziege	„	
„ „ „	„	Kaninchen	„	
„ ferox	„	„	„	
„ gigantea	„	„	„	
„ Huberiana alba plena	5 : 100	Taube	„	
„ „ „	1 : 100	Kaninchen	„	
„ humilis	„	„	„	sofort Agglutination
„ „ flava	„	Ziege	„	„ „
„ „	„	Kaninchen	„	
„ „	„	Ziege	„	sofort Agglutination
„ „	5 : 100	Taube	„	
„ laevis	1 : 100	Kaninchen	„	sofort Agglutination
„ Leichhardtii	„	„	„	
„ „	„	Ziege	„	
„ Metel	„	Kaninchen	„	sofort Agglutination
„ sarmentosa	„	„	„	
„ Stramonium	„	„	„	
„ „	„	Ziege	„	
„ Wrightii	„	„	„	
„ „	„	Kaninchen	„	
Salpiglossis variabilis coccinea	5 : 100	„	„	Hämolyse
„ „ grandiflora violacea	„	„	„	
Calceolaria nana hybrida	1 : 100	„	„	
„ „	„	Ziege	„	
Digitalis purpurea	5 : 100	Kaninchen	„	
Coffea arabica	„	„	„	
Cucurbita Pepo	1 : 100	„	„	
„ „	„	Hammel	„	
Lobelia erina	5 : 100	Kaninchen	„	
Helianthus annuus	1 : 100	„	„	
„ „	„	Hammel	„	
Artemisia argentea	5 : 100	Kaninchen	„	
„ campestris	„	„	„	
„ Mutellina	„	„	„	
„ rupestris	„	„	„	
Arnica montana	„	„	„	

Zu den weiteren Versuchen wurde nur *Datura Stramonium* verwendet.

Im Nachfolgenden wird die Wirkung von *Datura*extrakt und Ricin (Mercksches Präparat) verglichen.

Blutart (dreimal ge- waschen) $\frac{1}{2}$ ccm 5-proz.	Datura	
	Tropfen	Konzentration Proz.
		Wirkung
a. Kaninchen	2	0,2
b. "	1	0,2
c. "	1	0,1
a. Meerschwein-	2	0,2
c. " [chen]	1	1,0
a. Ziege	5	1,0
a. Hammel	2	1,0
b. "	5	1,0
a. Ratte	1	1,0
b. "	1	0,2
c. "	1	0,1
d. "	1	0,05
a. Pferd	1	1,0
b. "	2	0,1
c. "	1	0,1
a. Taube	1	1,0
b. "	2	0,2
c. "	1	0,1
d. "	1	0,05
e. "	1	0,025

Ricin wirkt, wenn auch nur schwach agglutinierend, auf Ziegenblut, während mit *Datura*extrakt keine Agglutination hervorgerufen werden konnte. Die agglutinierende Wirkung des Ricins ist bei Meerschweinchen- und Taubenblut kräftiger als die des *Datura*extraktes, während bei Hammel- und Pferdeblut das Umgekehrte der Fall ist. Gleich intensive Wirkung war bei Kaninchen- und Rattenblut vorhanden.

Die tatsächliche Wirkung des Extraktes aus *Datura Stramonium* ist aber kräftiger, als aus der Tabelle hervorgeht, denn bei Ricinus wurde das gereinigte Mercksche Ricin-Präparat verwendet, während bei *Datura* nur der aus

Blutart (dreimal ge- waschen) $\frac{1}{2}$ ccm 5-proz.	Ricin		
	Tropfen	Konzentration Proz.	Wirkung
a. Kaninchen	2	0,2	sofort stark agglutinierend.
b. „	1	0,2	Agglutination, gegen a kein deutlicher Unterschied.
c. „	1	0,1	Beginn der Agglutination nach 4 Minuten, nach 10 Minuten deutliche Agglutination. Grenze.
a. Meerschwein-	2	0,2	sehr starke Agglutination sofort.
b. „ [chen	1	0,1	in 1 Minute deutlich agglutinierend.
c. „	1	0,1	in 1 Minute deutlich agglutinierend, ungefähr so wie 1 Tropfen von 1-proz. <i>Datura</i> .
a. Ziege	5	1,0	nach 18 Minuten beginnende, nach 40 Minuten deutliche Agglutination.
a. Hammel	2	1,0	nach 2—3 Minuten beginnende Agglutination, schwächer als bei <i>Datura</i> .
b. „	5	1,0	nach 1 Minute, etwas schwächer als <i>Datura</i> , Unterschied nicht stark.
a. Ratte	1	1,0	Agglutination sofort.
b. „	1	0,2	Agglutination sofort.
c. „	1	0,1	Agglutination sofort.
d. „	1	0,05	nach 1 Minute beginnt die Agglutination schwach, vielleicht etwas stärker als bei <i>Datura</i> .
a. Pferd	1	1,0	Spur, vielleicht nach 3—4 Minuten.
b. „	2	1,0	nach 2 Minuten Agglutination beginnend.
c. „	3	1,0	nach 1 Minute beginnende Agglutination.
a. Taube	1	1,0	sofort Agglutination, etwas stärker als bei <i>Datura</i> .
b. „	2	0,2	sofort Agglutination, etwas stärker als bei <i>Datura</i> .
c. „	1	0,1	nach $\frac{1}{2}$ Minute Agglutination beginnend.
d. „	1	0,05	Agglutination so stark wie bei <i>Datura</i> , nach $\frac{1}{2}$ Minute.
e. „	1	0,025	Agglutination nach 1 Minute.

den mit der Testa zerriebenen Samen gewonnene Extrakt in Anwendung kam.

Verglichen mit den von Landsteiner und Raubitschek<sup>1)</sup> angegebenen Wirkungen von *Pisum*-, *Phaseolus*-, *Ervum*- und *Vicia*-Extrakten auf verschiedene Blutarten, ergeben sich auch wieder mit unserem Extrakt starke Unterschiede so, daß den einzelnen pflanzlichen Agglutininen eine gewisse spezifische Wirkung zugeschrieben werden kann.

Bei sämtlichen von uns untersuchten Blutarten konnten wir keine hämolytische Wirkung des *Datura*extraktes bemerken.

1) Landsteiner und Raubitschek, l. c. p. 665.

Von Kobert<sup>1)</sup> wurde die Wirkung der pflanzlichen Agglutinine auf die Plasmabewegung bei *Tradescantia* und *Vallisneria* geprüft, durch Ricin wird dieselbe gestört und die Zellen werden abgetötet. Wir haben den Einfluß von Daturaextrakt (1:100) auf die Plasmabewegung von *Elodea canadensis*, *Nitella* sp. und *Vallisneria spiralis* studiert, indem wir Teile dieser Pflanzen in Hochquellwasser, in Daturaextrakt mit Hochquellwasser, in Daturaextrakt mit 0,85-proz. Kochsalzlösung und in 0,85-proz. Kochsalzlösung allein legten. In allen Fällen wirkten die NaCl-Lösungen schädigend, die Bewegung wurde bald sistiert, und es trat Plasmolyse ein. In Daturaextrakt mit Wasser hielt die Bewegung lange an, jedenfalls länger als in Daturaextrakt mit Kochsalzlösung.

Agglutinierenden Einfluß auf Bakterien konnten wir bei Ricin und Daturaextrakt nicht feststellen. Verwendet wurden Typhus- und Cholerabakterien. Nur beim Extrakt aus *Phaseolus vulgaris* konnte eine schwache agglutinierende Wirkung auf die beiden genannten Bakterien wahrgenommen werden.

Aehnlich wie beim Ricin konnten auch durch Zusammenbringen von Daturaextrakt und Blutserum Fällungen erzeugt werden, und zwar zeigte sich, so wie es Kraus<sup>2)</sup> in Versuchen mit Ricin gefunden hatte, daß das Blutserum derjenigen Tierarten, deren rote Blutkörperchen von Datura agglutiniert wurden, von dieser Substanz ausgeflockt wurde. So z. B. geben sowohl Pferde- als Kaninchenserum in verschiedenen Mengenverhältnissen, gemischt mit Daturaextrakt, Niederschläge.

Dagegen erwies sich unser Präparat im Gegensatze zum Ricin vollkommen ungiftig. Auf die Conjunctiva von Kaninchen gebracht, rief Datura weder Entzündung noch sonst irgendwelche Erscheinungen hervor, und auch auf subkutane und intraperitoneale Injektionen verhältnismäßig großer Mengen

---

1) R. Kobert, l. c. Bd. 2, p. 699.

2) R. Kraus, Zeitschr. f. Heilkunde, 1901.



(bis zu 0,15 g) reagierten Kaninchen nicht mit Krankheitssymptomen. Das in *Datura* vorkommende Atropin war offenbar in so geringer Menge enthalten, daß es in der von uns injizierten Quantität des *Datura*extraktes noch keine merkbare Wirkung hervorbrachte. Auch Landsteiner und Raubitschek haben auf die Ungiftigkeit ihrer Agglutinine hingewiesen, da ja die bisher bekannten pflanzlichen Agglutinine (*Ricin*, *Abrin*, *Croton*, *Robin*) zugleich intensive Giftwirkungen auf den tierischen Organismus ausüben.

Gegen den verdauenden Einfluß von Pepsin erwies sich unser Agglutinin in hohem Maße resistent. Selbst nach 5-tägiger Einwirkung von Pepsin-Salzsäure bei 36° C ließ sich keine Abnahme der agglutinierenden Kraft des Extraktes feststellen. Das Agglutinin in Samen von *Ricinus* wird nach Versuchen von Jacoby<sup>1)</sup> durch Pepsin-Salzsäurebehandlung wesentlich abgeschwächt.

Endlich sei noch erwähnt, daß wir versucht haben gegen das von uns gefundene Agglutinin zu immunisieren; diese Versuche ergaben, wie wir gleich bemerken wollen, ein negatives Resultat.

Infolge der bereits erwähnten Ungiftigkeit unseres Präparates waren wir in der Lage, den Tieren relativ große Mengen zu injizieren. So wurden in einer Versuchsreihe 3 kräftigen Kaninchen in einem Zeitraum von 2 $\frac{1}{2}$  Monaten mittels subkutaner Injektionen ca. 0,7 g Trockensubstanz einverleibt. Zwei andere Kaninchen erhielten innerhalb 8 Wochen 0,9 g Trockensubstanz.

Die Sera dieser fünf vorbehandelten Tiere erwiesen sich bei der Prüfung auf agglutinationshemmende Eigenschaften nicht stärker hemmend als normale Kaninchensera. Allerdings übten schon die Blutsera normaler Kaninchen eine ziemlich starke Hemmung auf die Agglutination durch *Datura* aus. Wenn das Agglutinin und das Serum einige Minuten vor dem Zusatze der Blutaufschwemmung bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde, bewirkten 0,05 ccm normales Kaninchen-

---

1) M. Jacoby, Hofmeisters Beiträge, Bd. 1.

serum noch eine recht beträchtliche Verzögerung des Agglutinationsphänomens im Vergleiche zur Kontrollprobe.

Ein Vergleich mit Antiricin, gewonnen vom Kaninchen, zeigte, daß das Daturaagglutinin vom Antiricin nicht stärker gehemmt wird als von normalem Kaninchenserum. Es wurde 1 Tropfen 0,2-proz. Ricinlösung mit 0,05 ccm Antiricinserum und 0,5 ccm Blutaufschwemmung gemischt. Selbst nach 2-stündiger Beobachtung war in dieser Probe keine Agglutination eingetreten. Zwei weitere Proben wurden statt mit 0,05 ccm Antiricin mit derselben Menge Blutserum von Kaninchen aufgestellt, welche mit Daturaextrakt vorbehandelt waren; in diesen beiden Röhrchen war schon nach  $\frac{1}{4}$  Stunde Häufchenbildung eingetreten. Dagegen gab je 1 Tropfen 0,5-proz. Daturalösung, gemischt mit 0,05 ccm Antiricin oder der gleichen Menge verschiedener normaler Kaninchensera und Zusatz von je 0,5 ccm 5-proz. Kaninchenblutaufschwemmung, nach 15—20 Minuten Agglutination.

#### **Zusammenfassung.**

1) Im Samen einiger Arten und Varietäten kapselfrüchtiger Datureen ist ein Agglutinin für rote Blutkörperchen enthalten. Das vorzugsweise untersuchte Hämagglutinin von *Datura Stramonium* gibt auch mit den betreffenden Blutseris Fällungen.

2) Das Vorkommen eines Hämagglutinins bei Datureen bildet ein weiteres Unterscheidungsmerkmal dieser Gattung gegenüber den anderen untersuchten Solanaceen.

3) Das beschriebene Agglutinin ist ungiftig und reiht sich in dieser Hinsicht an die im Samen von *Phaseolus*, *Pisum*, *Ervum* und *Vicia* enthaltenen Agglutinine an.

4) Das Agglutinin aus *Datura* zeigt ebenso wie die anderen pflanzlichen Agglutinine eine elektive Wirkung in Blutkörperchen verschiedener Tierarten.

5) Es ist bisher nicht gelungen, gegen dieses Agglutinin zu immunisieren.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;  
Direktor: Geheimrat Professor Dr. Heffter (Abteilung für Im-  
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter Professor  
Dr. Friedberger).]

### **Ueber die Einwirkung von Arsenpräparaten auf den Ver- lauf der Lyssainfektion (Virus fixe) beim Kaninchen.**

Von Prof. Dr. E. Friedberger und Dr. F. Sachs.

Der günstige Erfolg, der in den letzten Jahren bei einer Reihe von Protozoenerkrankungen mit Arsenpräparaten, vor allen Dingen mit dem Atoxyl und seinen Derivaten erzielt wurde, ließen es naheliegend erscheinen, diese Mittel auch bei solchen Krankheiten zu versuchen, deren Erreger nicht bekannt sind, bei denen aber manches für ihre Protozoennatur spricht. So ist speziell der Einfluß des Atoxyls auf die Lyssainfektion des Kaninchens von Uhlenhuth (1), Heymann (2), sowie von Kraus und Grünberg (3) untersucht worden, die Autoren sahen jedoch keinen Erfolg.

Die günstige und der des Atoxyls überlegene Wirkung von Mischungen des Atoxyls und der Thioglykolsäure, die der eine von uns [Friedberger (4)] bei der experimentellen Nagana an Mäusen beobachtet hat, veranlaßten uns, trotz der ungünstigen Resultate mit Atoxyl, auch dieses Mittel noch einmal bei der Lyssa zu versuchen. Das war um so gerechtfertigter, als wir ja bis heute über kein Heilmittel verfügen, dem bei dieser Krankheit auch nur der geringste therapeutische Effekt zukommt.

Wir benutzten zu unseren Versuchen das Virus des Berliner Instituts für Infektionskrankheiten, für dessen lebenswürdige Ueberlassung wir dem Leiter der Wutschutzabteilung, Herrn Dr. Joseph Koch, zu Dank verpflichtet sind. Das Virus wurde im Mörser homogen verrieben, dann mit physiologischer Kochsalzlösung in bestimmtem Mengenverhältnis versetzt und durch eine einfache Lage gewöhnlichen Filtrierpapiers filtriert. Die Impfung geschah subdural ausschließlich an Kaninchen, und zwar wurde immer 0,5 Flüssigkeit des in den einzelnen Versuchsreihen verschieden verdünnten Virus injiziert. Wenn durch eine interkurrente Erkrankung oder durch zu starke Dosen des Heilmittels der Tod der Tiere innerhalb der Inkubationsperiode eintrat, so wurden fast in allen Fällen große Mengen des Zentralnerven-

systems dieser Tiere auf normale Tiere weitergeimpft, und diese Tiere blieben unbehandelt, oder wurden erst in Behandlung genommen, nachdem der Ausbruch der Lyssa bei ihnen über jeden Zweifel erhaben war. In einer Versuchsreihe wurden die Tiere nicht subdural, sondern intramuskulär mit relativ großen Dosen geimpft, ein Infektionsmodus, der nach Marx absolut zuverlässig ist und der auch in unseren Versuchen sichere Resultate lieferte.

Die Behandlung fand in jedem Fall erst nach der Infektion statt, es wurden Lösungen von Thioglykolsäure von 2 Proz. und Atoxyl 1 Proz.  $\bar{a}\bar{a}$ , die 24 Stunden bei 37° gestanden hatten, und die sich in den Naganaversuchen von Friedberger an Mäusen gut bewährt hatten, benutzt. Diese Mischung ist allerdings für Kaninchen relativ toxisch, und sie erzeugt namentlich bei subkutaner Applikation, die deshalb auch später verlassen wurde, starke sulzige Oedeme. Die dadurch bei den Tieren eintretenden Bewegungsstörungen erschweren oft nicht unbeträchtlich die klare Stellung der Lyssadiagnose. In der folgenden Tabelle I sind in Serie A einige Versuche zusammengestellt, bei denen eine sehr große Dosis von Virus fixe gegeben wurde. Infolge der großen Dosis des Heilmittels gingen die Tiere meistens schon im Inkubationsstadium an Vergiftung ein, aber das Gehirn war, wie sich aus den Resultaten der weiteren Impfung ergibt, durch die Behandlung nie frei von Erregern geworden. In Serie B sehen wir insofern einen Effekt, als bei Tier 42 eine deutliche Verzögerung der Infektion gegenüber dem Kontrolltier zu verzeichnen war. Diese, wenn auch minimale Wirkung ist bei einem Tier erfolgt, bei dem die Behandlung erst relativ spät einsetzte. Wir haben überhaupt die Beobachtung gemacht, daß eine möglichst frühzeitige Behandlung, die doch am ehesten a priori eine Heilwirkung vermuten lassen sollte, gerade ohne Erfolg ist. Vielleicht liegen die Verhältnisse beim Lyssaerreger, über dessen Entwicklung wir absolut nichts wissen, so, daß zunächst schwer angreifbare Dauerformen vorhanden sind, und erst mit dem Ausbruch der Symptome die vegetativen Formen, die mit chemischen Mitteln leichter angreifbar sind, im Organismus zur Entwicklung gelangt sind<sup>1)</sup>. Dann wäre es verständlich, weshalb wir da,

1) Durch eine ähnliche Annahme würde auch die geringe Wirkung des Atoxyls gegenüber Trypanosomeninfektion bei frühzeitiger Darreichung [Uhlenhuth, Hübner, Woithe (5)] eine einfache Erklärung finden.

**Tabelle I.**  
**Infektion mit Virus fixe, durch Papier filtriert, subdural am 10. Oktober 12 h. Dosis 0,5. Behandlung mit Thioglykolsäure**  
2 Proz. und Atoxyl 1 Proz. ää, 24-stündige Lösung subkutan.

No. des Tieres	Ge- wicht	Dosis des Virus	Behandlung								Verlauf der Krankheit			Weiter- impfung ergibt:
			Oktober								Ausbruch der Lyssa nach Tagen	Tot nach Tagen	Sektion	
			10. 6 Uhr	11.	12.	13.	14.	15.	17.					
Ser. A	50	0,5 $\frac{1}{50}$	0,5	0,4	0,7	0,7	0,45	0,15	—	8	9	Sulzige Oedeme an der In- jektionsstelle, rahmiger Eiter mit Kaninchen- seuchebacillen	Lyssa	
	40	dto.	—	0,5	0,8	0,8	0,6	0,15	—	—	6	Stark endzündliches Haut- ödem. Darm injiziert desgl.	Lyssa	
	46	"	—	—	0,7	0,7	0,75	—	—	7	5		Lyssa	
	49	"	Kontrolle								11			
	54	0,5 $\frac{1}{100}$	0,5	0,4	0,65	0,65	—	—	—	—	5	Pneumonie. Sulzig. Oedem desgl. desgl.	Lyssa	
B	48	dto.	0,5	0,4	0,7	0,7	—	—	—	—	5		Lyssa	
	55	"	—	0,3	0,6	0,6	0,6	—	—	—	5		Lyssa nicht weiter- geimpft	
	42	"	—	—	0,7	0,75	0,75	0,15	0,5	7	11		Lyssa	
	41	"	Kontrolle							5	7			
	52	0,5 $\frac{1}{1000}$	0,5	0,4	0,75	0,75	0,75	0,15	0,5	7 Lyssa?	9	Oedeme	Lyssa	
C	44	dto.	—	0,4	0,7	0,7	0,7	—	—	—	5	Pneumonie, Nephritis	Lyssa	
	43	"	—	—	0,7	0,7	0,7	0,15	—	—	7	Nihil. Lyssa?	Lyssa	
	47	"	—	—	—	0,6	0,6	0,15	0,4	—	ebt	Dauernd gesund		
	53	"	—	—	0,7	0,7	0,7	0,1	—	—	6	Oedem der Impfstelle	Lyssa	
	51	"	Kontrolle							8	12			

11\*

11\*

wo überhaupt Erfolge in den nachstehenden Versuchen zu verzeichnen sind, wir sie gerade bei solchen Tieren finden, bei denen die Behandlung erst relativ spät einsetzte. Dafür spricht auch das Verhalten des Tieres 47 in der folgenden Serie C, bei dem die Behandlung am spätesten begonnen wurde, das dauernd frei von Lyssasymptomen blieb und heute, nach 64 Tagen, noch völlig gesund ist. Die Möglichkeit, daß das Tier von Hause aus refraktär ist<sup>1)</sup>, ist nicht von der Hand zu weisen, da mit der Behandlung nicht bis zum Ausbruch der Lyssasymptome gewartet wurde, aber die Annahme, daß hier Lyssa wegen der kleinen Dosis etwa nicht zum Ausbruch kam, ist sehr unwahrscheinlich, denn 0,5 einer Virus-fixe-Verdünnung 1:1000 stellt bei subduraler Impfung noch eine sicher tödliche Dosis dar, wie dies von uns in zahlreichen Versuchen konstatiert wurde, und wie es auch die übrigen Tiere der Serie C und die 6 Tiere der folgenden Tabelle II dartun. Bei diesen Tieren wurde allerdings wohl wegen der relativ geringen Menge der Atoxyl-Thioglykolsäure-Mischungen, die diesmal, um die störenden Hautödeme zu vermeiden, intravenös gegeben wurden, keine Heilung, aber immerhin in einem Fall bei Tier 82 eine beträchtliche Lebensverlängerung gegenüber der Kontrolle No. 83 erzielt.

Es scheint also nach diesen Versuchen, daß den Mischungen des Atoxyls mit der Thioglykolsäure ein gewisser Heileffekt nicht abzusprechen ist. Wenn wir auch dem einen Versuch, in dem trotz einer ausreichenden Infektion nach erfolgter

Tabelle II.

Infektion mit Virus fixe  $\frac{1}{1000}$  (durch Papier filtriert), subdural. Dosis 0,5. Am 21. Okt. Behandlung mit Atoxyl-Thioglykolsäure (24-stündige Mischung) intravenös.

No. des Tieres	Gewicht	Behandlung nach Tagen						Verlauf der Lyssa	
		$\frac{1}{4}$	1	2	3	4	6	Ausbruch nach Tagen	Tod an Lyssa nach Tagen
78	1370	0,3	.	0,3	.	0,3	0,3	7	10
79	1570	0,3	.	0,3	.	0,3	0,3	7	10
80	1170	.	0,2	.	0,2	.	0,2	7	9
81	1120	.	0,2	.	0,2	.	0,2	8	10
82	1110	.	0,2	.	0,2	.	0,2	10	15
83	1350	Kontrolle						8	10

1) Natürlich werden wir, wenn in den nächsten Wochen, was ja kaum anzunehmen ist, noch Lyssasymptome auftreten, dieses Tier nochmals mit Virus fixe impfen, um zu sehen, ob es refraktär ist.

Behandlung die Symptome ausblieben (Tier No. 47), keine allzu hohe Bedeutung beimessen wollen, so berechtigt er doch mit Rücksicht auf die später mitzuteilenden Versuche dazu, hier an eine Heilwirkung zu denken.

Während wir mit diesen Versuchen beschäftigt waren, erhielten wir durch das liebenswürdige Entgegenkommen von Herrn Geheimrat Ehrlich ein Quantum Arsenophenylglycin<sup>1)</sup>. Die günstigen Erfolge, die wir mit diesem Mittel in Uebereinstimmung mit Ehrlich, Schilling, Uhlenhuth u. a. bei der Nagana erzielten, veranlaßten uns, die Versuche mit Atoxyl-Thioglykolsäure zunächst aufzugeben und sie mit Arsenophenylglycin fortzusetzen. Zunächst haben wir Untersuchungen angestellt über den Einfluß des Arsenophenylglycins auf das Lyssavirus in vitro. Derartige Versuche mit trypanoziden Stoffen sind von v. Eisler (6) und Heymann (l. c.) bereits mit Lyssavirus angestellt worden. v. Eisler fand, daß Dichlorbencidin und Toluidin in .0,5-proz. Lösungen bei halbstündiger Einwirkung das Lyssavirus in vitro nicht abzutöten vermögen. Nach Heymann hat „die Einwirkung einer 10-proz. AtoxylLösung bis zu 6 Stunden nicht vermocht, das Lyssavirus auch nur abzuschwächen“.

In Vorversuchen mit Nagana, in denen wir trypanosomenhaltiges Mäuseblut zu gleichen Teilen mit Verdünnungen des Arsenophenylglycins versetzten, ließ sich im Gegensatz zur Atoxyl-Thioglykolsäuremischung nur eine geringe Wirkung konstatieren; eine sofortige Abtötung fand nur bei Verdünnungen von 1:10 statt; in einer Konzentration von 1:100 blieben die Parasiten mindestens  $\frac{1}{2}$  Stunde am Leben.

Bei dem nunmehr zu besprechenden Versuche mit Lyssavirus schlugen wir eine Versuchsanordnung ein, deren Einzelheiten aus der Tabelle III zu ersehen sind. Bei derartigen Versuchen in vitro ist es, worauf Kraus ausdrücklich hingewiesen hat, besonders wichtig, ein fein homogenisiertes Virus ohne größere Gehirnpartikel zur Verfügung zu haben, in denen die Lyssaerreger vor der Einwirkung des Desinficiens geschützt bleiben können. Es wurde deshalb in dieser Versuchsreihe besonders auf eine vollständige Homogenisierung und sorgfältige Filtration des Virus Gewicht gelegt. Aus

1) Wir sind Herrn Geheimrat Ehrlich für die große Bereitwilligkeit, mit der er uns auch weiterhin dieses Mittel zur Verfügung stellte, sehr zu Dank verpflichtet.

Tabelle III.

Versuch über die Einwirkung des Arsenophenylglycins in vitro auf Virus fixe. Je 1 ccm Virus fixe 1:10, durch Papier filtriert, bleibt mit je 1 ccm fallender Verdünnungen von Arsenophenylglycin an kühlem Ort in Kontakt. Als Kontrolle 1 ccm der gleichen Virusverdünnung + 1 ccm Kochsalzlösung. Nach 5-stündigem Kontakt werden die Röhrchen scharf zentrifugiert, der Bodensatz wird nach Abguß der oben stehenden Flüssigkeit zur Entfernung der Reste des Arsenophenylglycins mit reichlichen Mengen Kochsalzlösung ausgewaschen, die Bodensätze werden in 1 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Infektionsdosis  $\frac{1}{2}$  ccm der Aufschwemmung subdural.

No. des Tieres	Gewicht	0,5 ccm Virus, das in Kontakt war mit Arsenophenylglycin	Verlauf der Lyssa	
			Ausbruch nach Tagen	Tod an Lyssa nach Tagen
161	1400	1:10	9	10
162	1400	1:10	9	13
159	1500	1:100	7	9
160	1360	1:100	9	12
164	1320	1:1000	—	6 (Pneumonie)
166	1350	1:1000	9	11
157	1250	1:10 000	9	10
156	1630	1:100 000	9	10
165	1320	1:100 000	6	6
168	1350	1:1 000 000	9	10
167	1450	Kontrolle	9	12
158	1570	„	9	11

der Tabelle III ergibt sich nun, daß in vitro dem Arsenophenylglycin ein abtötender Effekt auf das Lyssavirus auch in stärkster Konzentration und bei langer Einwirkung nicht zukommt. Auffallend ist allerdings der etwas späte Ausbruch der Symptome trotz der enormen Virusdosis. Es läge zunächst nahe, dies mit einer gewissen Abschwächung des Virus durch das Arsenophenylglycin zu erklären, doch spricht das bei allen Dosen gleichmäßig zu verzeichnende lange Inkubationsstadium dagegen. Die Ursache dürfte vielmehr auf eine durch das Zentrifugieren und Auswaschen bedingte geringe Schädigung des Virus zurückzuführen sein. Der negative Ausfall dieser Versuche in vitro durfte uns nicht abhalten, Heilversuche anzustellen. Wissen wir doch vom Atoxyl und einer Reihe seiner Derivate, darunter auch von dem Arsenophenylglycin, daß sie auf Trypanosomen in vitro gleichfalls nur in sehr geringem Grade einwirken, dagegen im Tierkörper einen ausgezeichneten Effekt entfalten.

Wir machten zunächst Versuche, bei denen wir als Virus das Gehirn der ohne Erfolg mit Atoxyl-Thioglykolsäure be-



handelten Tiere benutzten. Die Versuche sind in Tabelle IV zusammengestellt. Daß diese Gehirne bei dem Tode der Tiere an typischer Lyssa noch ihre normale Virulenz besaßen, bewies der Umstand, daß der Ausbruch der Symptome gegen die Norm absolut keine Verzögerung zeigte, wenigstens nicht bei 6 von den 8 Tieren dieser Tabelle. Bei 2 Tieren (Serie B) war allerdings das Inkubationsstadium um wenige Tage verlängert, aber auch diese Tiere zeigten am 10. Tage bereits deutliche, nicht verkennbare Symptome von Lyssa. Es ist uns nun in diesen 2 Fällen ausgesprochener Lyssa wohl zum ersten Mal gelungen, durch die Behandlung die Tiere innerhalb 3 Tagen zu heilen. Am 10. Tage nach der Infektion zeigten sich Symptome, über deren Charakter kein Zweifel bestehen konnte, und nur der an diesem Tag einsetzenden intensiven Behandlung ist es wohl zuzuschreiben, daß eine deutlich ausgesprochene Besserung und eine völlige Genesung innerhalb 4 Tagen eintrat. Ein Tier ging allerdings an der forcierten Behandlung zugrunde, aber seine vollkommene Heilung ist dadurch zur Evidenz erwiesen, daß 2 mit großen Mengen von Gehirn dieses Tieres intracerebral geimpfte Kontrollkaninchen völlig frei von Lyssa blieben und noch heute, nach 2 Monaten, gesund sind. Das andere Tier (58), das im ganzen etwas weniger Arsenophenylglycin erhalten hatte, war zwar durch die Behandlung sehr stark abgemagert, blieb aber bis heute (über 2 Monate) vollkommen gesund und hat nach Aussetzen der Behandlung alsbald wieder an Körpergewicht zugenommen und sein ursprüngliches Gewicht bei weitem überschritten (1870 g gegen 1600 g). Wenn es uns auch in beiden Fällen gelungen ist, eine Heilung sicherer Lyssa zu erzielen, so sei es doch gleich hier vorweggenommen, daß uns bei weiteren 34 Tieren bei mannigfacher Variierung der Dosis und der Behandlung ein derartiger Erfolg nicht wieder begegnet ist. Dennoch kann an einer Heilung in den obigen beiden Fällen kein Zweifel bestehen. Dieser Effekt ist aber wohl darauf zurückzuführen, daß hier besonders günstige Bedingungen vorlagen. Daß das Virus nicht durch die Behandlung nennenswert mitigiert war, das zeigt die hohe Virulenz der gleichartig behandelten Gehirne anderer Tiere. Aber da es sich um das Gehirn eines relativ früh interkurrent eingegangenen Tieres handelte, so war das Virus im Gehirn vielleicht noch wenig entwickelt, so daß selbst bei

Infektion mit Virus fixe aus den Gehirnen der in Tabelle I aufgeführten, an Lyssa gestorbenen Tiere. Virus durch Papier filtriert; Dosis 0,5 Virus  $1/_{60}$  subdural. Behandlung mit frischen Lösungen von Arsenophenylglycin in 0,8-proz. Kochsalzlösung, einmal auch mit Atoxyl-Thioglykolsäure (aus Mangel an Material) intravenös.

Digitized by Google

der hohen Dosis von 0,5 ccm 1:50 nur wenig Erreger überimpft wurden. Keinesfalls aber lag die verimpfte Menge etwa unter der Dosis minima; dafür spricht die Tatsache, daß die Lyssa deutlich zum Ausbruch gekommen war. In derartigen Fällen ist bisher aber noch niemals die Rettung eines Kaninchens gelungen<sup>1)</sup>. Hier kam zu der wahrscheinlich geringen Dosis des Virus noch der Umstand günstig hinzu, daß wir gerade für diese Versuche geringe Mengen eines Präparates zur Verfügung hatten, das offenbar relativ ungiftig war und von dem wir Dosen geben konnten, die die sonst tödlichen bei weitem übertrafen. Während wir mit verschiedensten Operationsnummern von Arsenophenylglycin schon bei einmaligen Dosen von 0,2 pro Kilogramm Kaninchen schwere Vergiftungssymptome und Tod beobachteten, konnten wir hier mehrere Male hintereinander bedeutend größere Dosen einspritzen. Selbst 0,5 pro Kilogramm Tier von dieser Operationsnummer tötete erst nach 6 Tagen. Leider standen uns von dieser Operationsnummer größere Mengen nicht mehr zur Verfügung, um weitere Versuche anzustellen. Es dürfte der relativ höheren Giftigkeit der übrigen Operationsnummern im wesentlichen zuzuschreiben sein, daß gleiche Heileffekte nicht mehr erzielt wurden. Wir verzichteten deshalb auf eine ausführliche Wiedergabe der übrigen zahlreichen Versuche und wollen uns nur noch darauf beschränken, eine Versuchsreihe mitzuteilen, in der das Virus intramuskulär gegeben wurde (Tabelle V). Wir nahmen an, daß bei diesem weniger eingreifenden Infektionsmodus eher ein befriedigendes Resultat zu erzielen sei als bei subduraler Impfung. Wie die Versuche der Tabelle V ergaben, bei denen allerdings wegen der Giftigkeit des Präparates kleinere Dosen gegeben werden mußten, war ein Heileffekt oder auch nur eine wesentliche Verzögerung der Infektion nicht zu erreichen.

Zur Zeit sind Versuche an Muriden mit Virus fixe von Fermi im Gang, das wir der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. R. Kraus, Wien, verdanken. Es ist bei der relativen Ungiftigkeit des Arsenophenylglycins für Muriden anzunehmen, daß hier eher Heilungen sich erzielen lassen.

Wir werden später über diese Versuche berichten.

1) Wassermann und Lentz berichten in der Berliner medizinischen Gesellschaft (Ref. Berl. Klin. Wochenschr. vom 30. November), daß sie in einem Falle bei einem Kaninchen, das mit Virus fixe infiziert war, durch die Behandlung mit Arsenophenylglycin eine Verlängerung des Lebens um 7 Tage gegenüber der Kontrolle konstatierten.

Tabelle V.

Versuch mit Virus fixe. 7 g Gehirn werden in 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung fein emulsiert und durch Papier filtriert. Dosis je 5 ccm intramuskulär in die langen Rückenmuskeln. Behandlung mit Arsenophenylglycin intravenös.

No. des Tieres	Gewicht	Behandlung nach Tagen										Erstes Auftreten der Lyssa nach Tagen	Tod an Lyssa nach Tagen
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
122	1220	0,2	.	.	0,15	.	.	.	.	0,1	.	9	10
123	1180	0,2	.	.	.	.	.	0,1	.	.	.	7	9
124	1240	0,2	.	.	0,15	.	.	.	.	0,1	.	7	10
125	1200	.	0,2	.	.	.	.	.	.	0,15	.	8	10
126	1170	.	0,2	.	.	.	.	0,15	.	.	.	7	8
													(Pneumonie als Nebenbefund)
127	1100	Kontrolle				.	.	.	.	.	.	6	9
128	1130	"				.	.	.	.	.	.	8	10
129	1190	"				.	.	.	.	.	.	6	10

## Zusammenfassung.

1) Mit Mischungen von Atoxyl und Thioglykolsäure ist es uns in einem Falle von Lyssa-Infektion mit Virus fixe gelungen, den Ausbruch des Inkubationsstadiums zu verlängern, in einem Falle vielleicht den Ausbruch der Lyssasymptome zu verhüten.

2) Das Arsenophenylglycin hat in vitro keinen abtötenden Einfluß auf das Virus der Lyssa.

3) Es ist uns in 2 Fällen von bereits deutlich ausgesprochener Lyssa gelungen, durch eine Behandlung mit Arsenophenylglycin die Tiere zu heilen. Dieser Erfolg beruht jedoch offenbar auf einer besonders günstigen Infektionsbedingung und einer besonderen Ungiftigkeit des verwendeten Präparates. Bei einer großen Anzahl (34) weiterer Infektionsversuche war keine Heilung mehr zu erzielen.

## Literatur.

- 1) Uhlenhuth, Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 30.
- 2) Heymann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 59, p. 362.
- 3) Kraus und Grünberg, in: Handbuch von Kraus-Levaditi, Bd. 1, p. 700.
- 4) Friedberger, Berl. klin. Wochenschr. 1908. No. 38.
- 5) Uhlenhuth, Hübner, Writhe, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. 1907. Bd. 27. Heft 2.
- 6) v. Eisler, Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, 1908, p. 71.

## Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. I. No. 2.

[Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie  
in Marburg a/L.]

### Ueber die intestinale Resorption von Serumantitoxin und Milchantitoxin.

Von Prof. Dr. Paul H. Römer (Marburg).

In den Magen eingeführte genuine Eiweißstoffe werden nicht als solche direkt in den Säftestrom des Organismus übergeführt, sondern sie unterliegen, wie bekannt, einer Spaltung durch die proteolytischen Fermente des Magendarmsaftes. Erst die Spaltungsprodukte (Albumosen, Peptone, Aminosäuren) werden resorbiert und erscheinen, nachdem sie zu genuinem Eiweiß in einer bisher noch nicht geklärten Weise und an einem bisher noch sehr diskutierten Ort wieder aufgebaut sind, im Blute des gefütterten Individuums wieder.

Eine eigenartige Ausnahme von dieser für alle Säugetiere gültigen Regel scheinen nun die bekannten Untersuchungen Ehrlichs<sup>1)</sup> über die Antitoxinübertragung durch die Milch bei saugenden Neugeborenen demonstriert zu haben. Denn nach allem, was wir über die Natur der Antitoxine wissen, sind sie unzertrennlich mit den genuinen Bluteiweißkörpern verknüpft, und auch in der Milch aktiv und passiv immunisierter Tiere sind sie lediglich an das genuine Molkenprotein gebunden. Die geringste Alteration des genuinen Eiweißmoleküls hat dementsprechend Antitoxinverlust zur Folge und Verdauung desselben, selbst wenn sie nur bis zur Bildung von Albumosen führt, bedeutet völlige Vernichtung der antitoxischen Funktion. Wunderbar erschien daher mit Recht bereits Ehrlich „die Tatsache, daß die mit der Milch entleerten Antitoxine als solche ungeändert vom Verdauungskanal in die Zirkulation gelangen können“, mit Recht „als eine bemerkenswerte Erscheinung, daß in diesem Falle die in der Milch enthaltenen Antikörper einer Zersetzung und Zer-

1) Ehrlich, Ueber Immunität durch Vererbung und Säugung. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12.

störung durch die stark wirkende Aktion der Verdauungssäfte nicht unterworfen sind“. Ehrlich glaubte, „den Schlüssel des Rätsels in der Eigenart der Milch“ suchen zu müssen.

Inzwischen ist durch mehrfache Arbeiten die Tatsache der intestinalen Antitoxinresorption bei saugenden Neugeborenen unserem Verständnis etwas näher gerückt. Ich selbst konnte nämlich zeigen, daß der Magendarmkanal neugeborener Individuen Antitoxin passieren läßt, nicht aber der älterer Individuen, eine Behauptung, die inzwischen durch ähnlich gerichtete Untersuchungen von Ganghofner und Langer<sup>1)</sup>, Uffenheimer<sup>2)</sup>, Hamburger<sup>3) 4)</sup> und Bertarelli<sup>5)</sup> bestätigt ist. An die Möglichkeit, daß das Alter des Tieres für die intestinale Resorption von Bedeutung sei, hatte übrigens schon Ehrlich gedacht. Ein Teil des Rätsels dürfte sich also mit meinen eben zitierten Feststellungen lösen.

Die Ehrlichsche Vermutung aber, daß „die Eigenart der Milch“ von nicht zu unterschätzender Bedeutung sei, trat von neuem in den Vordergrund des Interesses durch eine Arbeit Salges<sup>6)</sup>, der zeigte, daß bei menschlichen Neugeborenen Antitoxin überging, wenn er es der stillenden Mutter bzw. stillenden Amme in Form von antitoxischem Serum unter die Haut spritzte, daß dagegen jegliche Antitoxinresorption ausblieb, wenn er der Milch erst in der Flasche das antitoxische Serum zusetzte, oder den Säuglingen Ziegenmilch verabreichte, die infolge einer aktiven Immunisierung des Milch liefernden Tieres Antitoxin enthielt. Die Salgeschen

1) Ganghofner u. Langer, Ueber die Resorption genuinen Eiweißes im Magendarmkanal neugeborener Tiere und Säuglinge. Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 34.

2) Uffenheimer, Experimentelle Studien über die Durchgängigkeit des Magendarmkanals neugeborener Tiere für Bakterien und genuine Eiweißstoffe. Arch. f. Hyg., Bd. 59.

3) Hamburger, Ueber Eiweißresorption beim Säugling. Verhandl. d. 23. Vers. d. Gesellschaft f. Kinderheilkunde, Stuttgart 1906.

4) Hamburger, Ueber Eiweißresorption bei der Ernährung. Jahrb. f. Kinderheilkunde, Bd. 65.

5) Bertarelli, Ueber aktive und passive Immunisierung von Neugeborenen auf dem Verdauungswege. Centralbl. f. Bakt., Bd. 39.

6) Salge, Ueber den Durchtritt des Antitoxins durch die Darmwand des menschlichen Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 60, Heft 1.

Versuchsreihen lassen nun keine unmittelbare Vergleichung untereinander deshalb zu, weil es sich in dem einen Fall — mit Antitoxinübergang — um natürlich ernährte Kinder, im anderen Fall — ausbleibende Antitoxinresorption — um Flaschenkinder handelt; denn es wäre wohl denkbar, daß die Ernährung mit artfremder Milch an sich die Resorptionsbedingungen im Magendarmkanal so verändert, daß die Durchlässigkeit für antitoxisches Eiweiß nicht mehr besteht.

Es schien mir daher wünschenswert, Salges Versuchsideen in neuen Experimenten zu folgen, Versuchen aber, deren Anordnung physiologischen Bedingungen entsprach und die deshalb auch vergleichbare Resultate lieferten. Dies geschah in mit Much gemeinsam ausgeführten Experimenten, deren Ergebnisse wir vor 2 Jahren mitteilten<sup>1)</sup>. Die damaligen Versuchsergebnisse seien noch einmal kurz rekapituliert: Wir injizierten einem Teil der Versuchstiere (ausschließlich Rinder) Antitoxin in Form antitoxischen Pferdeserums subkutan, entweder vor dem Abkalben oder kurz nach demselben. Wir stellten dann die Menge Antitoxin fest, die in die Milch überging, stellten weiter fest, wieviel Milch und damit wieviel Antitoxin das von der Mutter genährte Kalb während der Versuchsperiode aufnahm, um dann endlich zu ermitteln, wieviel von dem gesamten verfütterten Milchantitoxin von dem jungen Kalbe resorbiert war. In einer anderen Versuchsreihe, in der die neugeborenen Kälber ebenfalls mit der genuinen rohen Muttermilch ernährt wurden, setzten wir erst in der Flasche das antitoxische Serum der Milch zu, und zwar dasselbe, das wir zu der ersten Versuchsreihe gebraucht hatten, in Mengen, die der Quantität des verfütterten Milchantitoxins der ersten Versuchsreihe entsprachen. Nach entsprechender Versuchsdauer wurde dann ebenfalls die Menge des resorbierten Antitoxins bestimmt; dabei zeigte sich, daß in der ersten Versuchsreihe ca. 10mal mehr Antitoxin übergegangen war, als in der letzten. Der Unterschied zwischen beiden Versuchsreihen bestand lediglich darin, daß in der ersten das antitoxische Pferdeserum den Körper des milchlifernden Muttertieres passiert hatte, daß also die Milch indirekt

1) Römer u. Much, Antitoxin und Eiweiß. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 63.

antitoxisch gemacht war, während in der zweiten dasselbe Antitoxin direkt zur Milch zugesetzt wurde, die allerdings hier in der Flasche gereicht wurde. Daß dieses letztere Moment aber keinen Einfluß auf die Antitoxinresorption hatte, wurde noch durch besondere Versuche festgestellt. Inzwischen hat Much<sup>1)</sup> die gleiche Versuchsanordnung auf den Menschen übertragen und auch hier das gleiche festgestellt, d. h. es gehen bedeutend größere Mengen Antitoxin auf den saugenden Neugeborenen über, wenn die Muttermilch im obigen Sinne indirekt antitoxisch gemacht wurde, als wenn direkt derselben antitoxisches Serum in entsprechenden Quantitäten zugefügt wurde. Wir haben es also wohl hier mit einer gesetzmäßigen Erscheinung zu tun. Worauf diese eigentümliche Differenz im Verhalten der Neugeborenen bezüglich der Antitoxinresorption beruht, darüber konnten wir nur hypothetische Bemerkungen machen.

Gelegentlich einer monographischen Zusammenstellung über die Bedeutung der Milch für Immunität und Immunisierung stieß ich in einer Arbeit Bertarellis<sup>2)</sup> auf folgende Behauptung: Bertarelli hatte an junge Hündchen Agglutinin verfüttert, und zwar an einen Teil der Versuchstiere durch direkte Eingabe agglutininhaltigen homologen Serums (also agglutininhaltigen Hundeserums), beim anderen Teil durch Verfütterung von Muttermilch, die infolge aktiv immunisierender Behandlung des Muttertieres agglutininhaltig geworden war. Bertarelli glaubt nun gefunden zu haben, daß auch hier bei der Verfütterung agglutininhaltiger Milch viel mehr Agglutinin vom Säugling aufgesaugt wurde, als bei direkter Eingabe des homologen antikörperhaltigen Serums. Es bestände somit ein großer Unterschied in der intestinalen Resorption von Serumantitoxin einerseits und Milchantitoxin andererseits selbst bei Verwendung eines homologen Antikörpers.

Ein genaues Studium dieser Arbeit Bertarellis führt aber zu dem Ergebnis, daß seine Versuche seine Behauptungen ganz und gar nicht bestätigen.

1) Much, Ueber die antitoxische Funktion und Eiweiß. Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 52.

2) Bertarelli, l. c.



Die wirklich vergleichbaren Versuchsreihen sind an jungen Hunden ausgeführt, an welche Typhusbacillen agglutinierendes Serum bezw. Typhusbacillen agglutinierende Muttermilch verfüttert wurde. Für die quantitative Berechnung legte Bertarelli die Agglutineinheit zugrunde; er versteht darunter diejenige Menge Agglutinin, welche im stande ist, den von ihm benutzten Typhusstamm 1:1 zu agglutinieren; ein Serum also, von dem 1 ccm notwendig ist, um den betreffenden Typhusstamm zu agglutinieren, enthält 1 AE (Agglutinin-Einheit) pro Kubikzentimeter, ein Serum, von dem  $\frac{1}{10}$  ccm genügt, 10 AE usw.

Bertarelli hat nun einmal neugeborenen Hunden direkt agglutinierendes Serum eingeführt. Es handelt sich um 6 Hunde von ca. 170 g Gewicht, es wurden denselben eingeführt Mengen von 4000 und 8000 AE und nach 6 Tagen das Serum untersucht. In der nachfolgenden Tabelle sei an dreien dieser Tiere das Ergebnis illustriert. Für die Berechnung ist zugrunde gelegt, daß einem Gewicht von 170 g eine Serummenge von höchstens 7—8 ccm entspricht. (Nach einer Mitteilung des Herrn Dr. Dibbelt, der über große Erfahrungen bezüglich der Blutmengen bei jungen Hunden verfügt, dürfte dies der Höchstannahme von Serum entsprechen.)

Hund No.	Gewicht	Verfütterte Antitoxinmenge	Zahl der gefundenen AE pro ccm Serum beim gefütterten Hunde	Gesamtmenge des Agglutinins im Serum des gefütterten Hundes	Insgesamt war resorbiert
1	160	4000 AE	20 AE	160 AE	$\frac{1}{25}$
2	160	8000 AE	30 AE	240 AE	$\frac{1}{38}$
3	180	4000 AE	25 AE	200 AE	$\frac{1}{20}$

Die Versuche bei weiteren Hunden ergaben etwa die gleichen Resultate. Es wurde also bei direkter Eingabe des agglutinierenden Serums in den Magen neugeborener Hunde durchschnittlich  $\frac{1}{25}$  der gesamten verfütterten Agglutininmenge resorbiert.

Die gleichen Versuche, angestellt an 12—40 Tage alten Hunden, ergaben Resorptionszahlen schwankend zwischen  $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{80}$  der verfütterten Menge.

Nun hat sich Bertarelli mit Recht die Frage vorgelegt, ob die Resorption von Antikörpern durch die Milch ohne

weiteres in Parallele zu setzen sei mit der Resorption von Antikörpern aus dem Blutserum: „Nun ist es immerhin möglich, daß bei den Neugeborenen und den Säuglingen, vielleicht auch bei den Erwachsenen, die diese proteische Fraktion betreffenden Absorptionsbedingungen nicht verglichen werden können mit denen, die wir in den praktischen Fällen passiver Immunisation mit der Milch immunisierter Tiere haben, wobei die Schutzstoffe (also wahrscheinlich auch das Agglutinin) an proteische Fraktionen der Milch gebunden sind, die dann ihrerseits ganz anders aufsaugbar sind als die proteische Fraktion des Blutes.“ Dementsprechend hat Bertarelli im zweiten Teil seiner Versuche an junge Hunde agglutininhaltige Muttermilch verfüttert, und zwar Muttermilch, die dadurch agglutininhaltig gemacht war, daß das milchliefende Muttertier aktiv mit Typhusbazillen immunisiert wurde. Für die Beantwortung der Frage, ob Differenzen in der intestinalen Resorption von Serumagglutinin einerseits und Milchagglutinin andererseits bestehen, muß nun der erste Versuch Bertarellis sofort ausscheiden; denn er hat einmal die Mutterhündin des betreffenden Versuches während der Gravidität aktiv immunisiert, es ist also nicht unmöglich bzw. nicht unwahrscheinlich, daß bereits intra uterum das Blut der jungen Tiere agglutinierende Funktionen bekommen hat; das beweisen auch ausdrücklich die Angaben Bertarellis. Nun ist es aber sehr schwer nachher zu entscheiden, welche Agglutininmenge beim jungen Hunde auf intrauterine Erwerbung oder auf extrauterine Gewinnung (Säugung) zurückzuführen ist. Wenn auch Bertarelli bei einem sofort post partum Getöteten der Jungen die intrauterin erworbene Agglutininmenge im Serum festgestellt hat, so erlaubt das noch nicht die geringste Schlußfolgerung bezüglich der anderen Ueberlebenden, da, wie bekannt, große individuelle Schwankungen in dem intrauterin erworbenen Antikörpergehalt des Blutes auch bei Tieren desselben Wurfes vorkommen. Endlich hat Bertarelli noch die milchliefende Hündin während der Laktation weiter mit Typhusbazillen behandelt, so daß ein Uebergang aktiv immunisierender Stoffe in die Milch und damit eine aktive Immunisierung des Neugeborenen auf intestinalem Wege nicht unmöglich ist.

Das gleiche trifft auf einen ähnlich angestellten zweiten Versuch zu, der aus denselben Gründen keine quantitative Ausmessung — darauf kommt es ja an — ermöglicht. Einwandfrei ist dagegen ein dritter Versuch. 3 Hündinnen (A, B, C) werden zu etwa gleicher Zeit gedeckt, von diesen werden A und B gegen Typhus immunisiert, C bleibt unberührt. Die Hündinnen gebären mit einem Abstand von 2—3 Tagen voneinander. Die 3 von der normalen Mutterhündin C geborenen Jungen hat er nun von der Hündin A bzw. B nahren lassen. Es haben also agglutininfrei geborene Hunde agglutininhaltige Milch bekommen. Die Menge des Agglutinins in der Milch dieser säugenden Ammen wurde vorher bestimmt und das Serum der damit gefütterten Neugeborenen nach 10 bzw. 20 Tagen auf die vorhandene Agglutininmenge untersucht. Die nachfolgende Tabelle illustriert das Ergebnis.

Hund No.	Genährt mit Milch von Hund No.	Menge des Agglutinins pro ccm der verfütterten Milch	Dauer der Säugung Tage	Gesamtmenge des Agglutinins in der Milch während der Versuchsdauer	Agglutininmenge pro ccm des Serums des gefütterten Jungen	Gesamtmenge des Agglutinins im Serum des Neugeborenen	Resorbiert war also im ganzen
C 1	A	80 AE	10	16 000 AE	20 AE	200 AE	$\frac{1}{80}$
C 2	B	60 AE	10	12 000 AE	10 AE	100 AE	$\frac{1}{120}$
C 3	A	80 AE	20	32 000 AE	40 AE	400 AE	$\frac{1}{80}$

Für die Berechnung ist zugrunde gelegt, daß, wie ich wiederum einer Angabe von Dr. Dibbelt verdanke, ein junger Hund pro Tag höchstens 20 ccm Milch aufnimmt, und daß seine Serummenge höchstens ca. 10 ccm beträgt. Bertarelli zieht die Schlußfolgerung, daß „die unter diesen Verhältnissen praktizierte passive Immunisation wirksamer ist als diejenige, welche dadurch erhalten wird, daß den Säuglingen auf dem Verdauungswege auch von derselben Tiervarietät kommendes agglutininresorbiertes Serum eingegeben wird“.

Vorstehende kritische Analyse führt aber zu dem umgekehrten Ergebnis; denn, wie die erste Tabelle lehrt, wurde von dem agglutininresorbierenden artgleichen Serum von den jungen Hunden auf intestinalem Wege im Mittel ca.  $\frac{1}{25}$  des gesamten verfütterten Agglutinins resorbiert, bei der Verfütterung agglutininhaltiger Muttermilch dagegen nur ca.  $\frac{1}{100}$ .

Es bestätigen also Bertarellis Versuche seine Behauptungen nicht.

Bertarellis Versuchsanordnung aber, sowie vor allem seine genannte Vermutung, die, wenn sie sich doch als richtig erweisen würde, von der allergrößten biologischen Bedeutung wäre, reizte mich doch, seine Versuche nachzuprüfen, wobei ich mich aber der Antitoxine bediente, weil diese die Möglichkeit viel genaueren quantitativen Arbeitens bieten und für die Frage der Immunität praktisch viel wichtiger sind.

Ich legte mir also die Frage vor: Wird antitoxisches Serum in der Tat vom saugenden Jungen schlechter resorbiert, wenn man es direkt in die Milch gibt, als wenn man die Milch dadurch antitoxisch macht, daß man dem Muttertier das Antitoxin injiziert? Für die Verwendung artfremden antitoxischen Eiweißes war dies ja schon durch meine früheren Versuche für das Rind, durch die Salges und Muchs für den Menschen bewiesen. Ich engte daher meine Fragestellung ausschließlich auf die Verwendung homologen Antitoxins ein; ich fragte mich also: Wird auch homologes Antitoxin vom saugenden Neugeborenen schlechter resorbiert, wenn man es ihm direkt in der Muttermilch gibt, oder wenn man letztere dadurch antitoxisch macht, daß man dem Muttertier das Antitoxin subkutan injiziert. Ich führte meine Versuche mit Tetanusantitoxin aus, weil sich mit diesem aufs einfachste und genaueste quantitativ arbeiten läßt. Meine Versuchsanordnung war damit gegeben; das Tetanusserum stammt vom Pferde. Ich mußte also am Pferde experimentieren; ich mußte in vergleichenden Versuchen jungen Fohlen abgemessene Mengen von Tetanusserum einmal direkt in den Magen einführen und einem anderen Teil der Versuchstiere das Antitoxin in der Form beibringen, daß ich das milchliefernde Muttertier passiv mit Tetanusserum immunisierte.

Leider war mir nur die Ausführung eines einzigen Versuches möglich, da die Pferde bereits im April und Mai im allgemeinen abfohlen und ich erst Mitte Mai von einer Auslandsreise zurückkam, und andererseits es auch nicht ganz leicht ist, bei den immer etwas mißtrauischen Pferdebesitzern Versuche durchzuführen, die mit Injektionen von Flüssigkeiten, Blutabnahmen etc. bei ihren wertvollsten Haustieren verbunden

sind. Der eine Versuch aber, über den ich hier berichten möchte, hat ein so eindeutiges Ergebnis gehabt und ist, wie ich wohl behaupten darf, auch so exakt durchgeführt, daß sich seine Mitteilung vielleicht doch lohnt, wenn ich auch die nachfolgenden Schlußfolgerungen aus seinem Ergebnis ausdrücklich noch so lange als hypothetische bezeichnen möchte, bis die Fortsetzung meines Versuchsprogramms im nächsten Frühjahr sie bestätigt hat. Nur stilistischer Einfachheiten halber sei mir ein mehr affirmativer Ton in den nachher zu nennenden Schlußfolgerungen erlaubt.

Zu dem nachfolgenden Versuch wurde ein Tetanusgift benutzt, das am 5. Nov. 1907 gewonnen war. Dasselbe wurde mit Hilfe eines konstanten Tetanustestantitoxins vor Beginn des Versuches genau auf seinen indirekten Giftwert geprüft und gleichzeitig auch der direkte Giftwert festgestellt.

#### A. Bestimmung des direkten Giftwertes.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Resultat
5868	10,5 g	0,0001 ccm	glatt
5870	11,0 "	0,00025 "	Spürchen Tetanus
5865	9,0 "	0,0005 "	mäßiger Tetanus
5897	11,5 "	0,001 "	† nach 60 Stunden
5883	19,0 "	0,002 "	† nach 48 "

Der direkte Giftwert betrug also pro ccm ca. 12 000 + Ms. oder 0,001 ist die tödliche Minimaldosis für eine Maus von 12 g.

#### B. Bestimmung des indirekten Giftwertes.

Der indirekte Giftwert wurde bestimmt mit Hilfe des genau 6-fachen Tetanusserums No. 70, indem verschieden abgestufte Giftmengen zusammen mit  $\frac{1}{1000}$  Antitoxineinheit in 0,4 ccm Gesamtfüssigkeit den Mäusen subkutan injiziert wurde.

Maus Nr.	Gewicht	Giftosis	Antitoxindosis	Resultat
5875	18,0 g	0,07 ccm	$\frac{1}{1000}$ ccm Tet. S. 70	† nach 7 Tagen
5874	20,0 "	0,08 "	do.	† nach 4 "
5879	18,0 "	0,09 "	do.	† nach 48 Stunden

Die von  $\frac{1}{1000}$  AE zu L $\dagger$  neutralisierte Giftdosis ist also 0,08 ccm. Während der ganzen Versuchsdauer wurde alle 8 Tage kontrolliert, ob der Wert des Giftes der gleiche während der Versuchsdauer geblieben war; er erwies sich unverändert.

### C. Einstellung des zu unserem Versuch benutzten Tetanusserums.

Zu dem nachher zu schildernden Versuch wurde ein in großen Mengen (Ballon) vorrätiges Tetanusserum benutzt; sein Antitoxinwert wurde gegen die im vorigen Versuch ermittelte Testgiftdosis von 0,08 ccm ( $= \frac{1}{1000}$  GE) ermittelt.

Maus No.	Gewicht	Giftdosis	Antitoxindosis	Resultat
5903	10 g	0,08 ccm	$\frac{1}{3500}$ ccm	Spürchen Tetanus
5867	12 „	0,08 „	$\frac{1}{5000}$ „	† nach 92 Stunden

Das Tetanusserum neutralisierte also in der Dosis von  $\frac{1}{5000}$  ccm  $\frac{1}{1000}$  GE;  $\frac{1}{5000}$  ccm enthielt also  $\frac{1}{1000}$  AE bzw. 1 ccm 5 AE.

Bei den nachfolgenden Antitoxinprüfungen handelt es sich vielfach um den Nachweis von so kleinen Antitoxinmengen, daß die eben ermittelte Giftdosis von 0,08 ( $= \frac{1}{1000}$  GE) für die Prüfung viel zu hoch war. Es mußten infolgedessen kleinere Giftdosen herangezogen werden. Nun ist aber durch v. Behrings Untersuchungen bekannt, daß zwar  $\frac{1}{1000}$  GE von  $\frac{1}{1000}$  AE zu L $\dagger$  neutralisiert wird, daß die Neutralisierungsformel von  $\frac{1}{10000}$  GE aber nicht etwa lautet:  $\frac{1}{10000}$  GE +  $\frac{1}{10000}$  AE = L $\dagger$ , sondern daß relativ größere Antitoxinmengen bei Anwendung kleinerer Giftdosen nötig sind. In den nachher aufzuführenden Versuchsprotokollen wurden Giftdosen von 0,08, 0,05, 0,04, 0,032, 0,016, 0,008, 0,004, 0,002 verwandt. In besonderen Versuchen wurden die diese Dosen zu L $\dagger$  neutralisierenden Antitoxinmengen ermittelt. Da die Aufzählung der einzelnen Protokolle zu sehr aufhalten würde, sei das Resultat kurz mitgeteilt. Es erforderten zur Neutralisierung bis zum L $\dagger$ -Wert:

0,08 ccm	= $\frac{1}{1000}$ AE	0,016 „	= $\frac{1}{4000}$ AE
0,05 „	= $\frac{1}{1800}$ AE	0,008 „	= $\frac{1}{5000}$ AE
0,04 „	= $\frac{1}{2000}$ AE	0,004 „	= $\frac{1}{10000}$ AE
0,032 „	= $\frac{1}{2500}$ AE	0,002 „	= $\frac{1}{20000}$ AE

Der Versuch selbst war folgender: Eine 10-jährige Fuchsstute (Belgier Kaltblut) hatte am 8. Mai 1908 ein gesundes Fohlen geworfen, das natürlich ernährt wurde und sich bis dahin gesund entwickelt hat. Am 2. Juni 1908, also 25 Tage nach der Geburt, wird dem jungen Fohlen eine Blutprobe abgenommen und auf Tetanusantitoxin geprüft.

Untersuchung des Fohlenserums vom 2. Juni 1908.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Serumdosis	Resultat
5867	9,0 g	0,0005 ccm	0,5 ccm 1-proz. Kochsalz	Spur Tetanus
5871	9,0 „	0,0005 „	0,5 ccm Fohlenserum	mäßiger Tetanus

Das Fohlenserum enthielt also, wie zu erwarten war, keine Spur Tetanusantitoxin; zu gleicher Zeit erhielt das Muttertier 90 ccm eines ca. 5-fachen Tetanusserums (= 450 Antitoxin-Einheiten) subkutan. Erfahrungsgemäß geht das so injizierte Antitoxin in das Blut und auch in die Milch über. Die Milch wurde nun nach 48 Stunden, nach 4 Tagen und nach 6 Tagen auf Antitoxin geprüft. Die Antitoxinbestimmungen ergaben folgendes:

Untersuchung der nach 48 Stunden abgenommenen Milchprobe.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Milchdosis	Resultat
5880	20 g	0,08 ccm	0,5 ccm	† nach 26 Stunden
5886	15 „	0,02 „	0,5 „	† „ 36 „
5884	14,5 „	0,008 „	0,5 „	† „ 3 1/2 Tagen

Die Milch enthielt also pro Kubikcentimeter ca  $\frac{1}{2500}$  AE, da 0,5 ccm derselben 0,008 ccm des Giftes neutralisierte, was (vergl. obige Tabelle)  $\frac{1}{5000}$  AE entsprechen würde.

Untersuchung der nach 4 × 24 Stunden abgenommenen Milch.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Milchdosis	Resultat
5885	10,0 g	0,08 ccm	0,1 ccm	† nach 18 Stunden
5891	20,5 „	0,008 „	0,1 „	† „ 36 „
5889	19,5 „	0,008 „	0,5 „	† „ 5 Tagen
5888	15,0 „	0,002 „	0,5 „	glatt

Die Milch enthielt also pro Kubikcentimeter etwas mehr als  $\frac{1}{2500}$  AE.

## Untersuchung der nach 6×24 Stunden abgenommenen Milch.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Milchdosis	Resultat
5906	10 g	0,04 ccm	0,5 ccm	† nach 26 Stunden
5905	10 "	0,016 "	0,5 "	† „ 45 "
5900	10 "	0,008 "	0,5 "	† „ 4 Tagen
5899	18,5 "	0,004 "	0,5 "	glatt

Die Milch enthielt also pro Kubikcentimeter  $\frac{1}{2500}$  AE.

Der Antitoxingehalt der Milch war während des 6 Tage dauernden Versuches demnach ziemlich konstant, im Mittel ca.  $\frac{1}{2500}$  AE pro ccm. Diese antitoxische Milch hat das Fohlen 6 Tage lang genommen. Wieviel AE sind nun im ganzen an das Fohlen verfüttert worden? Die Milchmenge, die das junge, genau 100 kg schwere Fohlen aufnahm, ließ sich nun nicht genau bestimmen; dieselbe beträgt aber, wie mir von autoritativer Seite mitgeteilt ist, auf keinen Fall mehr als 15 Liter pro 24 Stunden<sup>1)</sup>. Es hätte also im höchsten Falle das Fohlen aufgenommen  $\frac{15000}{2500}$  AE pro Tag, d. h. = 6 AE pro Tag, oder während der ganzen 6-tägigen Versuchsdauer 36 AE.

Am Morgen des 7. Tages (9. Juni 1908) wurde dem Fohlen eine Blutprobe abgenommen und auf Antitoxin untersucht:

## Untersuchung des Fohlenserums vom 9. Juni 1908.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Serumdosis	Resultat
5893	17,5 g	0,008 ccm	0,5 ccm	† nach 4 Tagen
5902	15,0 "	0,0066 "	0,5 "	geringer Tetanus
5895	11,5 "	0,004 "	0,5 "	glatt

Es enthielt also das Fohlenserum pro Kubikcentimeter genau  $\frac{1}{2500}$  AE.

Wieviel von dem gesamten verfütterten Antitoxin hat nun das Fohlen resorbiert? Wir müssen zu dem Zweck die Ge-

1) In einer früheren kurzen Mitteilung über diesen Versuch (vergl. Sitz.-Ber. der Gesellsch. zur Beförderung d. ges. Naturwissensch. zu Marburg, 1908, No. 6) ging ich von der Annahme aus, daß die Milchmenge, die ein junges Fohlen aufnimmt, höchstens 5 Liter beträgt. Diese Angabe bedarf aber, wie ich mich persönlich überzeugt habe, einer Aenderung auf 15 Liter. Dementsprechend ist auch die Berechnung im nachfolgenden, verglichen mit jener Mitteilung, entsprechend geändert und auch ein neuer Ergänzungsversuch an einem großen Pferde (vergl. später) vorgenommen worden.



samtmenge des Antitoxins im Fohlenblut wissen. Das Gewicht des Fohlens betrug 100 kg. Die Serummenge desselben läßt sich danach ungefähr auf 5 Liter berechnen; dann hätte das gesamte Fohlenserum also enthalten  $\frac{5000}{2500} \text{ AE} = 2 \text{ AE}$ . Es war nach dieser ziemlich groben Berechnung also etwa  $\frac{1}{18}$  der gesamten verfütterten Antitoxinmenge resorbiert. Tatsächlich aber entspricht, worauf Hamburger mit Recht hingewiesen hat, diese Berechnung nicht den tatsächlichen Verhältnissen, da man die Antitoxinmenge nicht richtig berechnen kann, die in den Organen oder sonstigen Körper-säften des Organismus festgehalten wird. Ich wandte daher, einem Vorschlage Hamburgers folgend, noch eine andere Kontrollprobe an: Einem normalen Pferde, dessen Blut tetanus-antitoxinfrei war, injizierte ich (aufs Gewicht berechnet) die gleiche Antitoxinmenge subkutan, die das Fohlen nach unserer obigen Berechnung mit der Milch bekommen hatte, und stellte fest, wieviel Antitoxin nach dieser Injektion im Blute erscheint.

Das in Betracht kommende Pferd hatte ein Gewicht von 570 kg, wog also genau 5,7mal mehr als das Fohlen. Da an das Fohlen nach unserer obigen Berechnung ca. 36 AE verfüttert waren, erhielt dieses Pferd von dem gleichen Tetanus-Ballonserum 40,0 ccm = 200 AE subkutan. Eine Blutprobe, die kurz vor dieser Seruminjektion abgenommen wurde, erwies sich antitoxinfrei. Die 24, 48 und 72 Stunden nach der Injektion vorgenommenen Blutprüfungen ergaben dann, daß die nach 48 Stunden abgenommene Blutprobe am antitoxinreichsten war, dieselbe wurde daher genauer ausgewertet.

#### Prüfung des Pferd-Serums.

Maus No.	Gewicht	Gift-dosis	Pferd-Serum	Resultat
5918	10,0 g	0,08 ccm	0,4 ccm	glatt
5933	11,5 "	0,08 "	0,25 "	Spürchen Tetanus
5923	13,0 "	0,08 "	0,2 "	† nach $3\frac{1}{2}$ Tagen
5932	12,0 "	0,08 "	0,1 "	† nach 60 Stunden

1 ccm des Serums dieses Pferdes enthielt also  $\frac{1}{2500} \text{ AE}$ .

Wir hätten also bei dem Fohlen ca.  $\frac{1}{2500} \text{ AE}$  pro Kubikcentimeter im Blutserum vorfinden müssen, wenn wir das Tetanusantitoxin unter die Haut injiziert hätten. Nach der Verfütterung der entsprechenden Menge fanden wir  $\frac{1}{2500}$ ,

es war also nach dieser Berechnung mindestens  $\frac{1}{12}$  der verfütterten Antitoxinmenge resorbiert, also ein recht erheblicher Prozentsatz.

Der zweite Teil meines Versuchsprogramms bestand nun darin, zu ermitteln, wieviel Antitoxin resorbiert wird, wenn man direkt das homologe antitoxische Serum (natürlich gemischt mit Muttermilch und unter Fortsetzung der natürlichen Ernährung) verfüttert. An einem anderen gleichaltrigen Fohlen zu experimentieren, war mir unmöglich, und andererseits wäre der Einwand individueller Differenzen zwischen beiden Versuchstieren berechtigt gewesen, falls die Antitoxinresorption in diesem zweiten Versuch quantitativ ein anderes Ergebnis geliefert hätte. Ich beschloß daher, an demselben Tier den Versuch fortzusetzen. Das Fohlen erhielt am 12., 13., 14., 15. und 16. Juni 1908 je 10 ccm desselben Tetanusserums, das in der ersten Versuchsperiode das Muttertier subkutan erhalten hatte, also insgesamt 50 ccm = 250 AE. Das Serum wurde gemischt mit der Muttermilch gereicht und von dem Fohlen gierig aufgenommen. Am 17. Juni wird dem Fohlen eine Blutprobe abgenommen. Im ganzen sind ihm also gereicht, wie erwähnt, 250 AE. Man hätte also pro Kubikcentimeter Blutserum, falls alles resorbiert wäre, ca.  $\frac{1}{20}$  AE erwarten können oder, falls die Resorption nur dem Resultat der ersten Versuchsperiode entsprochen hätte, mindestens  $\frac{1}{240}$  AE.

Untersuchung des Fohlenserums vom 17. Juni 1908.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Serumdosis	Resultat
5865	9,0 g	0,08 ccm	0,2 ccm	+ nach 48 Stunden
5882	9,5 "	0,04 "	0,5 "	+ " 22 "
5913	10,5 "	0,008 "	0,5 "	+ " 27 "
5914	10,0 "	0,004 "	0,5 "	+ " 36 "
5911	11,0 "	0,002 "	0,5 "	+ " 36 "
5908	9,8 "	0,001 "	0,5 "	+ " 60 "
5953	11,5 "	0,001 "	0,5 "	+ " 60 "
			1-proz. Kochsalzlösung	

Es enthielt also das Fohlenblut pro Kubikcentimeter weniger als  $\frac{1}{10000}$  AE, ja es war überhaupt keine Spur von Antitoxin mehr nachweisbar, wie der Versuch mit der kleinen Giftosis ergibt (vergl. Kontrollmaus No. 5953). Also trotzdem in dieser zweiten Versuchsperiode ungefähr 8—9mal mehr Antitoxin verfüttert war, hatte das Fohlen die Antitoxinmenge

in seinem Blute nicht nur nicht vermehrt, sondern sogar bis auf 0 vermindert. Wir kommen also zu dem Schluß, daß in der Tat homologes Antitoxin unter den genannten Versuchsbedingungen nicht resorbiert wurde, wenn man es direkt dem jungen Tier als Serumeiweiß reichte, daß aber ganz beträchtliche Mengen übergingen, wenn es in der Form antitoxisch-homologen Milcheiweißes ihm gereicht wurde.

Hier wäre aber ein Einwand möglich. Das Fohlen ist inzwischen älter geworden, und die Bedingungen für eine Antitoxinresorption waren möglicherweise mit zunehmendem Alter ungünstiger geworden. Diesen Einwand mußte ich um so mehr berücksichtigen, als ja von mir selbst der Nachweis stammt, daß mit zunehmendem Alter der Magendarmkanal undurchlässiger für Antitoxin wird. Man mußte auch deshalb an die Berechtigung dieses Einwandes denken, als ja auch von dem in der Milch des Muttertieres noch immer vorhandenen (indirekten) Antitoxin anscheinend nichts resorbiert war. (Die Menge dieses Milchantitoxins hatte allerdings, wie eine Prüfung ergab, inzwischen stark abgenommen.) Um nun diesem Einwand zu begegnen, führte ich das experimentum crucis aus. Ich erhöhte den Antitoxingehalt der Muttermilch von neuem dadurch, daß ich am 22. Juni 1908 der Mutterstute wiederum 100 ccm des gleichen Tetanusserums = 500 AE injizierte. In der Tat erhöhte sich der Antitoxingehalt der Milch wieder, wenn auch nur auf etwa  $\frac{1}{4000}$  AE pro Kubikcentimeter, was sich wohl aus der Verminderung genuinen Molkenproteins mit zunehmender Laktationsdauer (eine physiologische Erscheinung) erklärt. Am 29. Juni 1908 wurde dem dauernd mit dieser Muttermilch ernährten Fohlen wiederum eine Blutprobe abgenommen.

Untersuchung des Fohlenserums vom 29. Juni 1908.

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Serumdosis	Resultat
5944	9,5 g	0,008 ccm	0,5 ccm	† nach 48 Stunden
5935	8,5 „	0,004 „	0,5 „	† „ 60 „
5943	9,5 „	0,002 „	0,5 „	† „ 3 $\frac{1}{2}$ Tagen
5946	7,5 „	0,001 „	0,5 „	mäßiger Tetanus
5945	8,0 „	0,001 „	0,5 „	† nach 60 Stunden
			1-proz. Kochsalzlösung	

Es zeigte sich, daß in der Tat der Antitoxingehalt des Blutserums wieder gestiegen war, denn während sich am 18. Juni 1908 keine Spur von Antitoxin mehr fand, ließ sich jetzt etwa  $\frac{1}{10000}$  AE pro Kubikcentimeter Serum nachweisen. Es ist also zwar viel weniger Antitoxin übergegangen, als in der allerersten Versuchsperiode, was in der Tat darauf hinweist, daß die Bedingungen für eine intestinale Antitoxin-Resorption auch des Milchantitoxins ungünstiger geworden waren; diese dritte Versuchsperiode zeigt andererseits aber, daß der Magendarmkanal für Milchantitoxin qualitativ noch durchlässig war. Nehmen wir sodann weiter hinzu, daß während dieser dritten Versuchsperiode das Fohlen noch älter geworden war, als in der zweiten, und daß dennoch hier noch Antitoxin resorbiert wurde, wo in jener zweiten keine Spur übergegangen war, trotzdem mehr als 8-fach größere Antitoxinmengen verfüttert wurden, so scheint mir der Schluß unabweislich, daß sich der Säugling bezüglich der intestinalen Resorption von Serumantitoxin einerseits und Milchantitoxin andererseits sehr verschieden verhält; letzteres wird resorbiert, ersteres nicht, oder nur in verschwindend geringen Mengen.

Ich wiederhole noch einmal, daß weitere Versuche nötig sind, ehe dieser Satz eine gesetzmäßige Formulierung erhalten darf. Ich habe aber bereits früher einmal eine ähnliche Beobachtung gemacht. Ein 21 Tage altes Fohlen von 80 kg Gewicht erhielt in 4 aufeinander folgenden Tagen je 7000 Diphtherieantitoxin-Einheiten, im ganzen also ca. 28000 AE. Man hätte im Blut also, falls das Antitoxin sämtlich resorbiert wäre, eine Zunahme von 7 AE pro Kubikzentimeter finden müssen. Der antitoxische Gehalt im Fohlenblut, das durch vorhergehende Milchantitoxinfütterung bereits etwas antitoxisch war, war aber während dieser Serumantitoxin-Fütterungsperiode sogar gesunken. Hier fehlt allerdings das experimentum crucis, nämlich der Nachweis, daß zu dieser Zeit der Magendarmkanal des Fohlens für Milchantitoxin noch durchlässig war. Immerhin ist zu beachten, daß dies zweite Fohlen zur Zeit des Versuches nur 21 Tage alt war, während das Fohlen des zuerst mitgeteilten Versuches noch im Alter von ca. 6 Wochen Milchantitoxin intestinal resorbierte.

Schon in der eingangs zitierten Arbeit Ehrlichs findet sich ein ähnlicher Hinweis; denn Ehrlich teilt mit, daß er durch Verfütterung von Organteilen gegen Abrin und Ricin hochimmuner Tiere nie auch nur die geringste Andeutung von Antikörpern im Blut der gefütterten Tiere erzielte, selbst wenn er zu den Experimenten ganz junge Mäuschen verwandte. Vermutlich hat doch in diesem Experiment Ehrlich Organe immuner Mäuse verfüttert, d. h. auch homologes Antitoxin, das aber, wie wir jetzt mit noch mehr Recht vermuten dürfen, deshalb, weil es an Serum gebunden war, nicht zur Resorption gelangte. Ehrlichs scharfer Blick vermutete schon damals wohl mit Recht „den Schlüssel des Rätsels in der Eigenart der Milch“.

Wir müssen uns nun die Frage vorlegen: handelt es sich hier in der Tat um eine Eigenart der Milch an sich, oder handelt es sich nur um eine Eigenart der Muttermilch, d. h. verhält sich mit artfremder Milch eingeführtes Milchantitoxineiweiß bezüglich der intestinalen Resorption anders als mit artgleicher Milch verfüttertes Milchantitoxin?

Diese Frage müßte in der Tat erst ad hoc wieder geprüft werden, etwa mit der Versuchsanordnung, daß man beispielsweise jungen Fohlen antitoxische Pferd milch und ein andermal antitoxische Kuhmilch mit etwa entsprechendem Antitoxingehalt verabreicht und nun studiert, wieviel in beiden Fällen zur Resorption gelangt, Versuchsbedingungen, die nicht ganz leicht zu verwirklichen sind. Ich muß hier an eine Arbeit Salges<sup>1)</sup> erinnern, der menschliche Säuglinge mit diphtherieantitoxinhaltiger Ziegenmilch und 2 weitere mit typhusagglutinhaltiger Ziegenmilch, also mit heterologem Milchantitoxin bzw. heterologem Milchagglutinin fütterte, ohne daß Uebergang der betreffenden Antikörper ins Blut der Säuglinge nachgewiesen werden konnte.

Die Versuche Salges sind leider nicht ganz beweisend, da es sich in einem Teil der Fälle um zu alte Kinder handelt, in einem Fall um ein darmkrankes Kind und im letzten Fall endlich die Blutuntersuchung des Säuglings zu spät stattfand.

1) Salge, Ueber Immunisierung durch Milch. Zeitschr. f. Kinderheilkunde, Bd. 61.

Aus einer Reihe von Beobachtungen, die ich erst später mitteilen werde, glaube ich aber zu der Behauptung autorisiert zu sein, daß Salge trotzdem mit der Interpretation seiner Versuchsergebnisse recht hat, und daß in der Tat nur artgleiches Milchantitoxin, nicht artfremdes Milchantitoxin intestinal vom Säugling resorbiert wird, oder daß zum mindesten ein ganz erheblicher quantitativer Unterschied zwischen beiden besteht im Sinne einer bedeutend intensiveren Resorption des artgleichen Milchantitoxins.

Wir hätten es also mit einer Eigenart der Muttermilch zu tun und können somit für die Tatsache, daß bei Säuglingen antitoxisches Milcheiweiß mit der Muttermilch resorbiert wird, während im allgemeinen Antitoxine im Verdauungstraktus durch die Verdauungsfermente zerstört und auch sonst nicht resorbiert werden, zwei Gründe verantwortlich machen:

1) die von mir festgestellte größere Durchlässigkeit des Magendarmkanals für Antitoxin im allgemeinen und

2) eine Eigenart der Muttermilch, die so weit geht, daß sogar homologes antitoxisches Milcheiweiß sich bezüglich der Resorption anders verhält als antitoxisches Serumeiweiß, das von der gleichen Tierart stammt.

Wir stehen also vor einer höchst geheimnisvollen Funktion der Milchdrüse.

In einer früheren Arbeit hatten Much und ich<sup>1)</sup>, wie oben erwähnt, gezeigt, daß bei Anwendung artfremden Antitoxins mit der Muttermilch erhebliche Mengen übergehen, wenn dieselbe in der geschilderten Weise indirekt antitoxisch gemacht wurde, daß die Antitoxinresorption aber viel geringer ist, wenn man direkt, d. h. außerhalb des Tierkörpers, das artfremde Antitoxin der Milch zusetzt. Wir fanden weiter, daß die Molke einer Kuhmilch, der außerhalb des Tierkörpers tetanusantitoxinhaltiges Pferdeserum zugesetzt war, mit einem spezifischen Pferdeeiweiß fällenden sogenannten präzipitierenden Pferdeantiserum typische Fällung gab, während sie ausblieb mit einer Molke, die dadurch tetanusantitoxinhaltig gemacht war, daß dem betreffenden Milchtier tetanusantitoxin-

---

1) Römer und Much, l. c.

haltiges Pferdeserum subkutan injiziert war; sie blieb hier aus, obwohl der Antitoxingehalt, der doch nur von dem eingespritzten Pferdeserum herrühren konnte, genau demjenigen der ersten Molke entsprach. Da es sich damals nur um einen einzelnen Versuch handelte, machten wir unsere hypothetischen Schlußfolgerungen nur unter aller Reserve. Inzwischen hat Hamburger<sup>1)</sup> in ähnlich gerichteten Versuchen dieses letztgenannte Phänomen nachgeprüft und ist dabei zu negativem Ergebnis gekommen, Much aber hat in seinen oben zitierten Versuchen am Menschen wiederum positive Ergebnisse gehabt; es sei daher vorläufig dahingestellt, ob unsere oder Hamburgers Beobachtungen das Gesetzmäßige darstellen. Weitere Versuche sind hier dringend erwünscht.

Much und ich gaben auf Grund unserer damaligen Beobachtungen der Möglichkeit dreier Hypothesen Raum:

1) Das Antitoxin wird bei seiner Passage durch einen anderen Tierkörper und bei seinem Uebergang in die Milch gewissermaßen homolog, es geht die antitoxische Funktion vom Pferdeeiweiß auf das Rindereiweiß über. Diese Hypothese muß nach meinen obigen Feststellungen wohl als nicht zulässig erscheinen, da der Unterschied in der Resorption von direktem und indirektem Milchantitoxin auch bei Verwendung eines artgleichen Antitoxins sich zeigt.

2) Es bleibt das materielle Substrat der antitoxischen Funktion in der Milch bei indirektem Antitoxingehalt derselben an sich unverändert, dasselbe hat aber seine Reaktionsfähigkeit gegenüber einem spezifisch präzipitierenden Serum verloren und außerdem eine Modifikation in dem Sinne erfahren, daß es zur Resorption im Magendarmkanal Neugeborener geeigneter ist.

3) Die Milchdrüse vermag die antitoxische Funktion von dem genuinem Eiweiß, von dem sie bisher unzertrennlich erschien, zu trennen.

Speziell in der Richtung dieser dritten Hypothese habe ich nun noch einige weitere Versuche zur Ergänzung des oben geschilderten Fohlenversuches angestellt.

---

1) Hamburger, Ueber Antitoxin und Eiweiß. Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 6.

Nach den Feststellungen Dehnes und Hamburgers<sup>1) 2)</sup> führt der Zusatz eines spezifisch fällenden Antiserums zu einem antitoxischen Serum zur Neutralisierung der antitoxischen Funktion, selbst wenn eine sichtbare Niederschlagsbildung ausbleibt. Wenn in der auf indirektem Wege antitoxisch gewordenen Milch meiner Versuchsstute das Antitoxin nicht mehr gebunden an das genuine Eiweiß wäre, so könnte in der Tat bei dieser biologischen Methode der Nachweis einer Trennung geführt werden. Von diesem Gesichtspunkt aus ist der folgende Versuch vorgenommen:

9 ccm der Stutenmilch vom 24. Juni 1908 ( $1 \text{ ccm} = \frac{1}{4000} \text{ AE}$ ) wird mit 8 Tropfen einer 30-proz. Essigsäure versetzt, dann bis auf 12 ccm Wasser zugefügt und nach Abscheidung des Kaseins filtriert. Die so gewonnene Molke nenne ich Immunmolke.

9 ccm Stutenmilch, stammend von einer nicht mit Tetanusantitoxin behandelten normalen Stute, werden in genau der gleichen Weise verarbeitet, nachdem vorher 1 ccm  $\frac{1}{8000}$  des obigen Tetanusballonserums ( $= \frac{1}{600} \text{ AE}$ ) zugesetzt war. Es war also diese Milch auf etwa den gleichen Antitoxingehalt gebracht, wie die erste. Die hieraus gewonnene Molke nenne ich Antitoxinmolke.

Endlich wurde noch zum Vergleich eine direkte Verdünnung des Tetanusballonserums im Verhältnis 1:25000 benutzt.

Dann wurden zu je 2 ccm der Immunmolke einmal 1 ccm Pferdeantiserum zugesetzt, in einem anderen Röhrchen 1 ccm 1-proz. Kochsalzlösung. Die Röhrchen blieben dann  $1\frac{1}{2}$  Stunden bei  $37^\circ$  stehen, dann noch 5 Stunden bei  $22^\circ$  und wurden dann auf Antitoxingehalt geprüft. Genau in der gleichen Weise wurden je 2 ccm der Antitoxinmolke und der Pferdeserumverdünnung behandelt.

---

1) Hamburger und Dehne, Immunisierung mit artfremdem Serum. Wien. klin. Wochenschr., 1904, No. 16.

2) Dehne und Hamburger, Experimentaluntersuchungen über die Folgen parenteraler Einverleibung von Pferdeserum. Wien. klin. Wochenschr., 1904, No. 24.



Maus No.	Gewicht	Molke	Giftosis	Resultat
A. Mit Antiserum.				
5950	14,5 g	0,5 ccm Immunmolke	0,002 ccm	mäßiger Tetanus, erholt sich
5947	15,5 „	0,5 „ Antitoxinmolke	0,002 „	† nach 8½ Tagen
5948	17,0 „	0,5 „ $\frac{1}{25000}$ Ballonserum	0,002 „	† nach 3½ „
B. Ohne Antiserum (mit Kochsalzlösung).				
5956	13,5 g	0,5 ccm Immunmolke	0,002 ccm	glatt
5949	15,0 „	0,5 „ Antitoxinmolke	0,002 „	Spürchen Tetanus
5952	15,5 „	0,5 „ $\frac{1}{25000}$ Ballonserum	0,002 „	mäßiger Tetanus, erholt sich

Es hat also in allen drei Versuchen das spezifische Antiserum in gleicher Weise gewirkt, d. h. entsprechend Hamburgers Angaben das Antitoxin ausgeschaltet. Es spricht also das Ergebnis dieses Versuches nicht gerade für die sub 3 genannte Hypothese, allerdings auch nicht unbedingt dagegen, weil man an mechanisches Mitreißen des eventuell vom Eiweiß befreiten Antitoxins denken könnte. Ueber die eigenartige Umwandlung also, die artfremdes wie artgleiches Serumantitoxin bei seinem Uebergang in die Milch erfährt, kann ich keine Angaben machen, ich stelle nur die eigenartige Tatsache fest, daß es in der Milch in einer Form erscheint, in der es für die Resorption im Magendarmkanal neugeborener Säugender geeigneter ist. Wir stehen also vor einer höchst geheimnisvollen Funktion der Milchdrüse.

Die moderne Pädiatrie hat wohl nicht mit Unrecht die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der antitoxischen, bakteriziden und sonstigen aktiven Milchstoffe gelenkt, die im allgemeinen an die genuinen Molkenproteine gebunden sind. Aus diesen Anschauungen heraus ist in der letzten Zeit das Interesse für die Rohmilchernährung der Säuglinge wieder gewachsen, nachdem man so lange Jahre die Milch rein chemisch als ein totes Nährmittel betrachtet hatte. Aber jedem Kinderarzt ist weiter bekannt, daß auch die beste rohe Tiermilch nie die Mutterbrust dem Säugling ersetzen kann. Die Ueberzeugung aber, daß dies nicht nur deshalb der Fall

ist, weil die Muttermilch in ihrer grob-chemischen Zusammensetzung den jeweiligen Bedürfnissen des Säuglings am besten angepaßt ist, sondern daß hier bisher nicht deutbare, ungekannte und deshalb auch noch nicht künstlich nachzunehmende biologische Vorgänge eine wichtige Rolle spielen, findet ebenfalls immer mehr Anerkennung.

Der geschilderte Versuch beweist von neuem, wie fein die Milchdrüse arbeitet, wenn sie nützliche Stoffe, wie immunität-verleihende Antitoxine, die im Blute der Mutter in einer Form kreisen, in der sie der Säugling nicht (oder nur in minimalen Mengen) resorbieren könnte, so umzugestalten weiß, daß wenigstens in der ersten Säuglingsperiode diese nützlichen Stoffe fast quantitativ durch den Magendarmkanal hindurch ins Blut des Säuglings gelangen. Wie der Mechanismus dieser Umformung ist, darüber kann ich noch keine Angaben machen. Es wird mich dieses Problem noch weiter beschäftigen.

#### Zusammenfassung.

Ich ziehe aus dem Mitgeteilten folgende Schlußfolgerungen:

1) In einem Fohlenversuch zeigte sich der Intestinaltractus des Versuchstieres durchlässig für Muttermilchantitoxin, dagegen nicht für homologes, d. h. artgleiches Serumantitoxin, obwohl von letzterem erheblich größere Mengen verfüttert wurden.

2) Wenn später anzustellende Versuche dieses Ergebnis bestätigen, so ist damit die Behauptung Bertarellis als richtig erwiesen, daß ein Unterschied in der quantitativen Resorptionsmöglichkeit zwischen homologem Milchantitoxin und homologem Serumantitoxin besteht im Sinne einer stärkeren Resorptionsmöglichkeit des Milchantitoxins.

— — —

## **Die Immunitätsreaktionen als physikalische, speziell als Kolloid-Phänomene.**

Von Prof. Dr. H. Zangger.

Die vorliegende Arbeit soll die wesentlichen Tatsachen eigener und fremder Arbeiten zusammenfassen, die dazu dienen können, die einzelnen Phasen des Mechanismus bei den Immunitätsreaktionen nach den heutigen physikalisch-chemischen Kenntnissen zu charakterisieren. Daß bei den Heilungsvorgängen strukturierte kolloidale Gebilde zerstört werden, ist klar; daß viele Substanzen, die dabei eine Rolle spielen, ebenfalls nicht den gewöhnlichen Gesetzen der Lösung gehorchen, weiß jeder.

Alle diese Stoffe haben im Gegensatz zu den reinen Lösungen eine Gruppe von Eigentümlichkeiten, die wir unter dem Begriff des kolloidalen Zustandes zusammenfassen, doch muß gleich betont werden, daß dieser Begriff heute ein sehr großes Gebiet und sehr variable Dinge umfaßt.

Zuerst werden die bei den Reaktionen sich überall zeigenden Gesetzmäßigkeiten beschrieben werden und speziell die charakteristischen quantitativen und zeitlichen Verhältnisse, weiterhin die Versuche der physikalischen Zerlegung und Synthese jener Körperkomplexe, die die Vorgänge bedingen, und schließlich die kolloidalen Grenzschichten, die Membranen, und die mit ihrem Bestehen und ihren Funktionen <sup>1)</sup> eng verknüpften Vorgänge: Zerstörung der Membran, Lysis, Verquellung und Agglutination, Opsoninwirkung.

Die meisten neuen Tatsachen, die einer einheitlichen Auffassung bedürfen, liegen heute in den Experimenten vor, die zum Ausbau der Immunitätsreaktionen vorgenommen wurden,

---

1) Es ist sehr auffällig und muß als medizinisch von höchster Bedeutung hingestellt werden, daß feste Kolloide einmal auf sehr kleine Zusätze außerordentlich empfindlich, und vor allem, daß das chemisch identische Kolloid unter Umständen verschieden empfindlich ist, je nach seinem Zustand. Wenn auch noch ein weiter Weg ist zu der temporären Empfindlichkeit auf pharmakologische Mittel, so liegt die Analogie doch sehr nahe.

welche mit dem Schwerpunkt zum Teil in der Physiologie, zum Teil in pathologischen Vorgängen liegen.

Bevor ich die Stellung der Theorien und die allgemeine Bedeutung der Tatsachen der Immunität besprechen will, stelle ich einige für den eigenartigen Charakter der Immunitätsreaktionen typische Vorgänge und Beispiele voran, die zusammen weder die chemische Strukturlehre heute, noch die einfache Lösungstheorie (der Gleichgewichte) zu erklären vermögen:

Antikörper werden nur durch Kolloidsubstanzen erzeugt, einen Antikörper auf ein Kristalloid zu erzeugen, gelang bis heute nicht.

Die Verbindungen entstehen nicht nach den Gesetzen der konstanten multiplen Proportionen.

Ein typisches, stabiles Gleichgewicht wird nicht erreicht.

Die Reihenfolge der Mischung bedingt das Endresultat wesentlich.

Die Antikörper lassen sich durch Kataphorese transportieren (Coehn, Bechhold, Henri), lassen sich elektrisch umladen (mit einer einwandfreien Methode von Pauli und Landsteiner neuerdings nachgewiesen).

Wir wissen alle, daß wir keine chemischen Mittel kennen, ein aktives Serum von einem inaktiven zu unterscheiden, auch die gewöhnlichen, physikalischen wie chemischen Methoden geben keine typischen Abweichungen, hingegen die Kolloid- und Fällungsreaktionen. Henri hat nachgewiesen, daß konstante typische Unterschiede sich zeigen in der Fällbarkeit durch andere Kolloide, das ist wohl die am meisten typische Eigenart der Kolloidreaktionen.

Ein Toxin-Antitoxingemisch, das für eine Tierart unschädlich ist, ist für eine andere Tierart giftig.

Ein Toxin-Antitoxingemisch, das in einer bestimmten Dosis für ein Tier unschädlich ist, kann für dasselbe Tier in derselben Dosis schädlich werden, wenn man dasselbe Gemisch vorher verdünnt.

Ein Toxin-Antitoxingemisch erzeugt trotz Neutralisation Antikörper. Die Reaktionen gehen nur unter Beisein von Elektrolyten vor sich, mindestens sind sie außerordentlich von

Elektrolyten abhängig, wie wir es nur bei Kolloidreaktion in diesem Ausmaße kennen <sup>1)</sup>).

Ein Tier, das einmal immunisiert ist, produziert weiter Antikörper, wenn man ihm nach und nach die ganze Menge seines Blutes entzieht, ohne jede weitere Injektion von Immunitätskörper provozierenden Substanzen.

P. Müller fand, daß durch die Immunisierung die Absorptionsschnelligkeit der Antikörper zunehmen könne bis zum 10—300-fachen, daß beim Serum in vitro (Typhus) die Absorptionsschnelligkeit im Laufe der Zeit wieder zurückgeht; die absolute Grenze der Absättigungsfähigkeit bleibt aber nach Müller meist ziemlich gleich.

Verbindungen von Toxin-Antitoxin, wie auch Verbindungen von Zellen und deren Antikörpern, die anfangs etwas reversibel sind, werden immer weniger reversibel.

Durch HCl unwirksam gemachte Toxine werden bis zu  $\frac{2}{3}$  wieder toxisch durch Alkalisierung (Morgenroth, Dörr), aber nur außerhalb des Körpers. Damit verlieren sie auch die leichte Diffusionsfähigkeit der HCl-Toxine (Komplexbildungstendenz).

Pick, Schwoner und Pribram haben auf die Eigenschaft der Toxolabilität aufmerksam gemacht.

Die Toxine verlieren durch eine ganze Reihe von Zusätzen vorübergehend oder dauernd ihre Eigenschaften. Als solche Zusätze fanden sie mehrwertige Kationen der verschiedenen Art und einige organische Stoffe, die nur die Lösungs- und Zustandsbedingungen von Kolloiden ändern können (Pribram).

Marie und Tieffenau stellten fest, daß Tetanustoxin durch wasserhaltige Hirnsubstanz gebunden wird, durch nicht gequollene aber nicht.

Die Immunkörper halten hohe Temperaturen in konzentrierten Lösungen viel länger aus als in Verdünnungen.

---

1) Auffälligerweise geht die Heilwirkung der Seren (speziell auch antitoxischer Seren) manchmal gar nicht der antitoxischen Kraft parallel. Man kann Fälle beobachten, wo z. B. das Serum eines Tieres trotz Abnahme der antitoxischen Kraft ziemlich die gleiche Heilwirkung beibehält (Kraus). Seren können eine gleich hohe antitoxische Kraft haben ohne gleiche Heilwirkung, sie können wirksamer werden in einzelnen Fällen ohne Steigerung der antitoxischen Kraft.

Bei Verdünnungen nimmt die Wirksamkeit nicht entsprechend der Verdünnung ab, sondern nach ganz anderen, von Fall zu Fall feststellbaren Gesetzen.

Daß die Kolloide und ihr Zustand im Organismus wechseln können, geht jetzt auf das deutlichste (parallel den Fällungsversuchen von Henri) aus den charakteristischen verschiedenen Ausfällbarkeiten von Serumkolloiden hervor, so bei Syphilis, schwerer Tuberkulose, je nach Gesundheitszustand zeigt ein und dasselbe Individuum bedeutende Schwankungen<sup>1)</sup>.

Die Präzipitation etc. von anorganischen Kolloiden durch Seren schwankt von Tier zu Tier und bei demselben Tier zu verschiedenen Zeiten<sup>2)</sup>.

Auf rein osmotische Veränderungen sind diese Phänomene nicht zurückzuführen, denn größere osmotische Schwankungen kommen in den vorliegenden lebenden Organismen nicht vor.

Friedberger hat in der letzten Zeit eine Reihe von Experimenten publiziert über die Konservierung der so labilen Komplementfunktionen des Serums. Salze verschiedener Art, wie Natrium-Chlorid, Kalium-Ammonium-Nitrat, machen das Serum in Lösungen von 4—8 Proz. weniger temperaturempfindlich und konservieren die Komplementeigenschaften überraschend lange. Wir haben in unserem Institut schon vor längerer Zeit bei systematischen Untersuchungen über den Einfluß der Elektrolyte auf die zeitlichen Verschiebungen der Kolloideigenschaften, speziell der Gelatine, die äußerst merkwürdige und sehr verwandte Beobachtung gemacht, daß geringe Konzentrationen die zeitlichen Veränderungen, die Zunahme der Viskosität stark begünstigen, daß Lösungen von 1,0—2,8 n-Ammoniumnitrat z. B. die Viskosität konstant erhalten, während höhere Konzentrationen eine Verflüssigung im Laufe der Zeit erzeugen.

Die Tatsache, daß die Komplementwirkung eines Serums von derselben Salzkonzentration konserviert wird, wie die Viskosität, z. B. der Gelatine, spricht ebenfalls für den

1) Porges, Wassermann, Sachs, Levaditi, ferner Landsteiner, Salomon u. a.

2) Field, Soc. for exper. Biology and Medicine New York, 18. Febr. 1908.

Zusammenhang der Komplementwirkung mit dem Kolloidzustand <sup>1)</sup>).

Wie verhalten sich gegenüber diesen Tatsachen in ihrer Gesamtheit die bestehenden Theorien?

1) Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie operiert mit chemischen Vorstellungen, mit den Begriffen der Bindung und der Spezifität der Stoffe: sie stützt sich auf die Tatsache, daß gewisse Bakterien und andere Zellen bestimmte, in Serum gelöste Stoffe erst absorbieren und dann in der Folge aufgelöst oder zu anderen Funktionen veranlaßt werden. Die Absorption ist genau studiert worden, sie ist aber nur ein Teil resp. Vorakt des wesentlichen Vorganges, des Gesamtvorganges der Auflösung, die eine tief eingreifende physikalische Zustandsänderung ist. Wenn es nicht zur Lösung kommt, haben diese Substanzen für das Wachstum und die Vermehrung der Bacillen meist keine Folgen. Erfahrungsgemäß hebt eine Absorption von einzelnen Substanzen die Struktur nicht auf und hemmt meist auch die anderen Prozesse nicht, solange die Struktur nicht geändert ist.

Eine Spezialform der chemischen Theorie war die ursprüngliche Auffassung von Arrhenius, der diese Tatsachen durch die Gesetzmäßigkeiten der Lösungsgleichgewichte etc. ausdrücken wollte. Aus dem analogen Reaktionsverlauf wurde auf Wesensverwandtschaft der Vorgänge geschlossen.

2) Im Gegensatz zu diesen Theorien, die mit den Lösungsgesetzen, den chemischen Gleichgewichten und den Reaktionen chemischer Komplexe rechnen, steht die morphologische Theorie von Metschnikoff und die Opsonintheorie der Immunität nach Wright, der zwar jene Vorstellungen akzeptiert, sie aber nicht als das ganze Wesen dieser Reaktionen betrachtet, sondern nur als eine Phase oder Parallelerscheinung der Heilungsprozesse. Wright löst also die Phagocytose in einen vorbereitenden Prozeß und in den morphologisch nachweisbaren Eintritt und Durchtritt durch die Zellmembran auf. Daß in der Zelle sehr ungleiche Prozesse sich abspielen können, läßt Wright in seinen Deutungen unberührt, ebenso wie die Art dieser Prozesse. Metschnikoff und Wright, zum

---

1) Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide, Aug. 1908.

Teil auch Gruber, stellen also den morphologisch verfolg-  
baren Vorgang, daß Bakterien in die Leukocyten hineingeraten  
und manchmal im Stadium des Zerfalles beobachtet werden  
können, als Basis der Theorie des Heilungsprozesses auf.

Man fragte sich aber bis heute nicht, durch welche Vor-  
aussetzungen physikalischer und chemischer Art der Phago-  
cytierungsprozeß bedingt sei. Daß nicht alle Bakterienarten  
ohne weiteres aufgenommen werden, konnte jeder beobachten,  
ebenso daß unter bestimmten Bedingungen die Bakterien  
leichter, zahlreicher und in anderen fast gar nicht aufgenommen  
werden. Daß Leukocyten Bakterien sich nähern oder nicht,  
nannte man positive und negative Chemotaxis und stellte sich  
prognostisch den Vorgang als die Parallelerscheinung der  
Heilungsvorgänge und deren Intensität vor.

Ebenso wurde als biologisches Rätsel belassen, wenn die  
gleichen Bakterien in einem Falle aufgenommen werden und  
im anderen nicht, oder wenn von zwei Bakterienarten die  
eine aufgenommen wird, die andere nicht. Auf die Zer-  
legung der Phagocytierung in ihre Einzelphasen, wie An-  
näherung des Bakteriums an Leukocyten, Verbindung der Ko-  
härenz und der Struktur der Bakterien und peripheren Hülle,  
Lösung der morphologisch darstellbaren Kolloidkörner, Fetzen  
etc., Destruktion des Individuums durch physikalische Tren-  
nung der differenten physikalischen Teile, wurde, vielleicht  
sogar bewußt, verzichtet.

Die Beobachtung, daß Seren die Phagocytose erhöhen,  
d. h. daß durch Vermittelung eines dritten Stoffes, der aus  
dem Serum verschwindet, die Aufnahme ermöglicht, resp. be-  
schleunigt werde, wurde der Ausgangspunkt der Opsonintheorie.

Auch die Opsonintheorie, welche die Phagocytose als  
durch einen dritten spezifischen Stoff vermittelt annimmt, läßt  
sich auf keine Zerlegung der Vorgänge ein und ist daher für  
eine so detaillierte Beschreibung unzureichend, wie sie für eine  
so komplizierte und von so vielen Faktoren abhängige Erschei-  
nung wünschenswert ist.

3) Die dritte Auffassung ist die Kolloidtheorie der Im-  
munität.

Das leitende Moment bei den folgenden Betrachtungen  
liegt in dem Umstand, daß die bei den Immunitätsreaktionen



in Betracht kommenden Stoffe Kolloide sind, und zwar nicht gelöster Art, sondern in irgendeiner Weise geformte, strukturierte Gebilde. Es kommen also bei diesen Reaktionen immer mindestens zwei geformte Reaktionskomponenten in gegenseitige Beziehung. Die Systeme sind also nicht homogen.

Kolloide Substanzen, die unter sich in Beziehung treten, können außerordentlich verschiedene Substanzpaare sein. Allen gemeinsam ist, daß sie in sich und mit dem Milieu (Wasser oder Kristalloidlösung) nicht im Gleichgewicht stehen, sondern in Spannungszuständen sind, die einem Ausgleich zustreben.

Derartige geformte Kolloide unterliegen folgenden, für sie charakteristischen Veränderungen:

- a) Abscheidungsprozessen, Präzipitation, Agglutination;
- b) entgegengesetzten Veränderungen, Verteilung und Affinitäts erhöhungen der Kolloide zum Milieu, Quellung, Lösung, Peptisation, Herauslösen eines Kolloids aus einem anderen Kolloid, das sogar strukturiert bleiben kann (wie häufig bei Hämolyse und Bakteriolyse).

Die Kolloidtheorie versucht nun die Immunisierungsvorgänge durch analoge Veränderungen zu erklären.

Es fragt sich also, ob die chemische Theorie oder die Kolloidtheorie einen besseren Ausdruck der Immunitäts sachen liefert.

Wann ist die chemische Deutung eines Prozesses gerechtfertigt? Wenn genügend Reaktionen vorliegen, um chemische Konstitutionen anzunehmen, oder wenn sogar die auf der chemischen Strukturvorstellung basierende Synthese geglückt ist, dann ist ein Vorgang als chemisch eindeutig charakterisiert.

In vielen Fällen, wie z. B. bei Alkaloiden und Farbstoffen, ist die Struktur zwar nicht bis ins letzte bekannt, aber bestimmte Ersatzreaktionen geben die Sicherheit, daß bestimmte Atomgruppen vorliegen, mit deren Veränderung die Eigenschaften des Gesamtkomplexes in bestimmter Richtung und in einem bestimmten Grad dauernd verschoben werden.

Was wissen wir in dieser Hinsicht über die Immunkörper? Wir kennen sie eigentlich nur aus einer Wirkung, deren Dosierung überdies bis heute nur auf biologische Art möglich ist. Jede Einwirkung solcher Art, die wir als Voraussetzung

für eine Ermittlung der chemischen Konstitution anerkennen, zerstört die typische Eigenschaft des Körpers immer dauernd.

Infolge dieser Labilität der Immunkörper erscheint es uns unmöglich, auf dem Wege der chemischen Veränderung derselben einen chemischen Charakter des Immunitätsvorganges nachzuweisen. Man hat dabei versucht, auf Grund der Sätze der rein chemischen Kinetik die chemische Natur dieser Vorgänge zu erweisen.

Wenn ein Vorgang nach den Gesetzen der Reaktionsgeschwindigkeit und des Reaktionsgleichgewichtes verläuft, so ist man von seiner chemischen Natur überzeugt. Nun zeigt es sich aber, daß die Konsequenzen, die sich aus der Annahme von Adsorptions- und Diffusionsphänomenen für das Gleichgewicht und für den zeitlichen Verlauf ableiten, angenähert formal identisch sind mit den aus der chemischen Kinetik abgeleiteten.

Es läßt sich also in diesem Gebiet nie entscheiden, ob z. B. eine leicht dissoziierende, chemische Verbindung oder eine einfache Adsorption vorliegt, und ebenso kann ein Diffusionsphänomen den Gang einer monomolekularen Reaktion täuschend nachahmen.

Zum Unglück haben alle diese Kurven, durch die man diese Verhältnisse ausdrücken kann, von vornherein gewisse Stücke gemeinsam: 1) Zur Zeit 0 ist die umgesetzte Menge = 0. 2) Die Beeinflussung des Gleichgewichtes und der Geschwindigkeit erfolgt in allen Fällen im gleichen Sinne, wie die Konzentration. 3) Sowohl bei chemischen, als auch bei physikalischen Vorgängen dieser Art ist immer ein asymptotischer Verlauf zu konstatieren, d. h. vollständige Sättigung tritt erst bei sehr großem Ueberschuß des einen Bestandteils, vollständiges Gleichgewicht erst nach langer Zeit ein.

Nun sind die Versuche auf dem Immunitätsgebiet doch mit wesentlich größeren Fehlern verknüpft, als etwa Messungen einfacher chemischer Reaktionen oder Untersuchungen über Diffusion von Kristalloiden. Es ist daher nur zu begreiflich, daß die Klasse von Kurven, die den genannten Bedingungen genügt (Nullpunkt — gleichsinniger Verlauf, Asymptote), durch geeignete Wahl der Konstanten immer die Versuchsergebnisse so gut wiedergeben wird, als es nach der

Versuchsmethodik überhaupt möglich erscheint. Es muß also ausdrücklich davor gewarnt werden, ohne große Versuchsreihen, die sich auf weite Intervalle sämtlicher Variablen beziehen, Schlüsse auf die Natur des Vorganges aus den Kurven zu ziehen.

Bereits bei einem möglichst einfach gebauten heterogenen System, z. B. einer Emulsion, würde die Anwendung der unveränderten Formeln der chemischen Kinetik vollständig irreführen, um so mehr ist dies der Fall bei den natürlichen kolloidalen Strukturen.

Die Form der Kurven ist also zur Entscheidung der Frage: „Physikalische oder chemische Vorgänge?“ ungeeignet.

Wenn schon ein exakter Beweis für die Richtigkeit einer chemischen Theorie nicht möglich war, so fragt es sich nun, inwieweit sie sachlich den Tatsachen adäquat ist und in welchem Verhältnis die logischen Konsequenzen der Theorie zu der Erfahrung stehen.

Sachlich scheint die chemische Theorie nicht begründet, da über die Chemie der Immunkörper überhaupt nichts Sicheres bekannt ist, auch erscheint sie in ihren Konsequenzen nicht haltbar, weil die chemischen Vorstellungen bei der großen Variation der Tatsachen zu starr erscheinen, um sich, trotz aller Hypothesen, der Vielfältigkeit der Erscheinungen anzupassen.

Infolgedessen war es notwendig, nach anderen Vorstellungen zu suchen, die eine gedankliche Beherrschung der Gebiete ermöglichten. Diese Vorstellungen sind heute gegeben in dem großen Erscheinungsgebiet der Kolloide.

Diese Körper zeigen die für die Biologie wichtigsten Eigenschaften nur in Kombination mit bestimmtem flüssigen Milieu, sind also im allerweitgehendsten Sinne abhängig von der Umgebung und den relativen Verhältnissen, und zwar nicht nur von der Struktur, Beweglichkeit des Milieu (Viskosität etc.), die ja auch bei typischen Lösungen von Einfluß ist, sondern sie werden durch alle für eigentliche Lösungen transitorischen Einwirkungen, leichtes Erwärmen, Schütteln, Stehenlassen, resp. mechanische Einwirkungen dauernd verändert.

Die Kolloidtheorie trägt also gerade den typischen Eigentümlichkeiten der Immunkörper Rechnung.

Wir haben es demgemäß mit physikalisch ausgedehnten Komplexen zu tun: Nicht alle Anteile, die reagieren können, liegen direkt an der Oberfläche. In dem Sinne haben wir zweiphasige Systeme. Durch die Reaktion selbst werden in der zweiten Phase meist noch ganz andere neue Verhältnisse geschaffen.

Als Grundvorstellungen der Kolloidtheorien ergeben sich also: Die Geschwindigkeit der Reaktionen ist bedingt durch den Uebergang zwischen den verschiedenen Phasen. Das Gleichgewicht hängt von der Verteilung der einzelnen Phasen und von den Oberflächen (Grenzschichten) ab. Die Ausdehnung der Phasen und deren Grenzschichten ist von wesentlichem Einfluß.

Diese Annahmen, daß geformte Massen und Größen mittels eines bestimmten neuen Faktors, der Grenzflächenfunktionen, in die Reaktion hinein spielen, sind auch bei der Wirkungsweise vieler pharmakologischer Mittel realisiert, wo Lösungsfunktionen (Teilungskoeffizient) und chemische Funktionen und gleichzeitig Flächen- und Absorptionsfunktionen konkurrieren. Hier werden aber bei der ungeheuren Verteilung der Massen die Konzentrationsverschiebungen in den Grenzflächen, speziell an den Kolloiden und Membranen eine größere Rolle spielen, als man heute annimmt (auch schon Verschiedenheit der Reihenfolge wird die Endwirkung verschieben).

Die hier gegebene Anschauungsweise zeigt einen anderen Weg, die Immunitätsvorgänge zu analysieren, sich vorzustellen. Er mag den Fernerstehenden in manchen Punkten weniger bestimmt und eindeutig erscheinen, aber er entspricht den Tatsachen, die wir heute wirklich kennen, besser.

Wenn die Analogisierung von Immunitätsvorgängen und Kolloidvorgängen noch stellenweise Unklarheiten enthält, so ist größtenteils die Ursache davon der Umstand, daß unsere Definitionen des Kolloidalzustandes heute noch in mancher Richtung unscharf sind. Soweit aber die Kolloidprozesse genauer bekannt sind, finden sie sich in den Tatsachen heterogener Art bei den Immunitätsvorgängen wieder.

Eine andere Auffassung hat ja dann ihr Recht, wenn sie aus der nicht beweisbaren Analogie heraus die bekannten

Vorgänge mit anderen als wesensidentisch erweisen kann, so daß keine Analogie resp. Fiktion, sondern Identitäten betrachtet werden können.

Was verlangt man von einer solchen Theorie? Möglichste Uebereinstimmung in allen, auch den divergentesten Eigenschaften.

Von den Immunkörpern kennen wir nur die Reaktionsgesetze im bestimmten Milieu und ihre Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur, vor allem der Zeit. Wir kennen ihre Beeinflußbarkeit durch Lösungsmittel, speziell Elektrolyte; ihre Labilität, Empfindlichkeit auf äußeren Einfluß: Temperatur, Licht, Elektrizität, Schütteln.

Alles dies finden wir bei den Kolloiden wieder.

Wenn wir auch bald dazu kommen sollten, die strukturelle Grundlage der Immunität zu kennen, als die Grundlage der sie bedingenden kolloidalen Zustände, welcher Absorptions- und Lösungseigenschaften folgen, so bleibt die Tatsache des Kolloidzustandes noch gerade so bedeutungsvoll und für die Vorgänge entscheidend, weil die strukturelle Anordnung der Moleküle zum Komplexgebilde doch das Typische für das Leben bleibt und speziell untersucht werden muß.

Besonders wichtig ist aber die Eigenschaft der Kolloide, kontinuierliche, langsame Zustandsänderungen zu erleiden, was mit dem graduellen Charakter der Immunität, Anpassung und Resistenz in bester Uebereinstimmung steht<sup>1)</sup>.

### Synthetische Versuche und Beweisführung.

Theoretisch und praktisch entscheidend für die Bedeutung einer bestimmten Auffassung der Immunitätsvorgänge ist der synthetische Aufbau und die voraussagbare Beeinflussung des Verlaufes durch künstliche Einführung bekannter Komponenten.

In meiner Arbeit von 1905 konnte ich vorerst nur auf die Bedeutung der synthetischen Beweisführung hinweisen.

1) Es ist mir, wie wohl allen Anhängern der Kolloidtheorie jederzeit bewußt und klar geblieben, daß chemische Reaktionen intervenieren können, daß der Kolloidzustand selber zum Teil eine Folge der chemischen Konstitution, aber vor allem auch eine Funktion der Beziehungen zum Lösungsmittel und zu dritten Stoffen ist.

denn es lagen damals nur die Absorptionsversuche an Komplementen etc. (Stoudensky etc.) und die Hämolyseversuche mit künstlichen Kolloiden, Kieselsäure, Lecithine (Landsteiner) vor.

Die Lecithide anderer Art wurden von ihren Entdeckern als typische chemische Verbindungen angesehen.

Inzwischen haben die bewußt synthetischen Versuche mit Kolloiden folgende Resultate ergeben. Die quantitativen Versuche, gemacht mit bekannten Kolloiden und Kolloidkomplexen, speziell Saponin, Natrium-Taurocholat, haben bewiesen, daß sich mit diesen typischen Kolloiden dieselben Verlaufskurven ergeben, wie für die Immunitätsvorgänge, vor allem daß sich die Wirkungen zweier Kolloide, von denen jedes einzeln hämolytisch wirkt, sich nicht summieren, sondern sich je nach der Reihenfolge unterstützen oder hemmen können<sup>1)</sup>.

Kolloidkomplexe von Saponin und von kolloidalem Eisenhydroxyd wirken hämolytisch, aber in geringerem Grade als die einzelnen Komponenten; bei Hämolyse durch solche Kombinationen ist der Grad der Hämolyse auffälligerweise weitgehend unabhängig von der Blutkörperchenkonzentration, analog wie dies Henri für die Serumhämolyse nachgewiesen hat<sup>2)</sup>. Bekanntlich konnte mit keiner chemischen oder mit den gewöhnlichen physikalisch-chemischen Methoden nachgewiesen werden, was für eine Veränderung die aktiven Seren bei einer Erwärmung auf 56° erleiden; die Kolloid-  
ausfällungsmethoden mit entgegengesetzt geladenen Kolloiden ergaben aber sehr auffällige Differenzen, indem die Kolloide des erhitzten Serums viel leichter und bei anderen Konzentrationen sich von der Flüssigkeit lostrennen und ausfallen<sup>3)</sup>.

Die Beobachtungen von Kyes u. a. über die Komplementfunktionen des Lecithins und anderer ähnlicher

---

1) Zangger, Recherches quantitatives sur l'hémolyse avec les substances colloïdales définies. La saponine. Compt. rend. Soc. biol., T. 63, 1905, No. 13, p. 589. — Ders., L'hémolyse par des complexes colloïdaux, saponine et taurocholate de soude. Compt. rend. Soc. biol., T. 63, No. 37.

2) Levy; Henri et Levy, Compt. rend. Soc. biol., 1905.

3) Henri et Cernovadeanu, Différence entre le sérum chauffé et le sérum normal. Compt. rend. Soc. biol., 1907; Semaine médical, Sept. 1907.

Körper auf Cobragift, ferner Skorpionengift, Bienengift (Morgenroth und Carpi), Abrin (Pascucci) haben nach verschiedenen Richtungen zu synthetischen Untersuchungen Veranlassung gegeben.

Die an Stelle des Lecithins verwendeten Kolloide waren: Kephalin (Kyes), Jecorin (P. Mayer), Tiolein, Oelsäure (Noguchi), Seifen (Liebermann).

Auch hier fand man, daß sich Kolloide von an sich gleicher Wirkung beim Zusammenwirken ihre Leistungen nicht addieren, sondern nach Mischungsverhältnissen sich unterstützen oder sich hemmen können<sup>1)</sup>, wie W. Frei in meinem Institut 1906 feststellen konnte, Noguchi 1907.

Alle diese Substanzen wirken häufig als eine Art Komplement gegenüber diesen Giften, teilen jedoch eine Reihe der Eigenschaften der natürlichen Komplemente nicht, sie sind thermostabil, ertragen Magensaft und Trypsin (nach Morgenroth und Kyes), und müssen in relativ hohen Konzentrationen verwandt werden, so daß die Deutung noch nicht klar ist. Sicher ist aber, daß diese Substanzen nicht in Lösungen, sondern als Kolloid vorliegen und als solche bereits lytisch wirken könnten.

Die Lipoidе, speziell das Cholesterin als Suspension in wässriger Lösung (kolloidal nach Porges), wirken antitoxisch, wie von verschiedenen Seiten bestätigt wurde, und zwar erwies sich Cholesterin entgiftend auf pflanzliche, wie tierische und Bakteriengifte.

Cholesterin wirkt antitoxisch gegen eine ganze Reihe kolloidaler Gifte und speziell auch gegen solche, die typische Antigene sind und Immunitäten erzeugen, wie Tetanotoxin und Tetanolysin (P. Th. Müller, Kyes und Sachs, Kraus und Clairmont), Schlangengift (Sachs), Bienengift (Morgenroth und Carpi, P. Th. Müller), gegen Vibriolysin (Pribram, Eisler).

Bei Staphylosin jedoch fand Eisler, daß sowohl der Alkoholätherextrakt, wie der Eiweißniederschlag hemmende

---

1) W. Frei, Zur Theorie der Hämolyse. Dissert. Zürich, 1906/07. — Noguchi, Biochemische Zeitschrift, 1907.

Funktionen haben, ferner wirkt Cholesterinsuspension intensiv hemmend auf kolloidale Pflanzengifte, wie Saponin, Solanin etc.

Für eine Bedeutung lipoider Substanzen für die Immunität sprach vor allem auch der Befund Hahns, der zu dem Schluß kommt: „Immunisierung bedeutet Zunahme des Petrolätherextraktes“.

Die Lipaide können zum Teil als Antitoxine, zum Teil als Komplemente oder Beizen (Kieselsäure), als Antikomplemente, Antiagglutinine, Antiambozeptoren (Porges, Neubauer, Rosenberg), als Agglutinine auf Taubenblut (Lazoc) verwendet werden. Frei fand, daß sich die Funktionen stark mit den Konzentrationen verschieben.

Mit anerkannten kolloiden Stoffen wurden eine Reihe von Immunitätsreaktionen reproduziert, z. B. durch Fermente (Neuberg und Reichel etc.), eine Reihe von Seifen wurden in inaktiven komplizierten Serensystemen eingeführt (Neurin-Seifen sollen am besten wirken) und dabei Aktivierung beobachtet, allerdings mit relativ hohen Dosen, die aber in normalen Seren noch nicht wirksam sind. Mit dem Prozeß der Aktivierung scheint mir auch eine Veränderung des ultramikroskopischen Bildes vor sich zu gehen. Analysieren wir die Eigenschaften dieser Körper in bezug auf ihre Analogien zu komplementhaltigem Serum einerseits, andererseits auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der komplementersetzenden Körper, so wurden bis jetzt folgende Punkte festgestellt:

Durch bestimmte Seifen komplementiert, haben viele Seren die Eigenschaften von natürlichen Immunseren z. B.

Sie sind entsprechend thermolabil, d. h. das System Serum + Seifen wird bei 56° in seinen Kolloidalstrukturen verändert und zwar in bezug auf die lytische Wirkung; auch geringe Seifenkonzentrationen wirken auf die Abtrennbarkeit aus dem Flüssigkeitssystem (Fällung), wie es Henri und Cernovadeanu für die Seren im allgemeinen nachgewiesen haben.

Diesen synthetischen Versuchen parallel ging der Versuch der Trennung der Bestandteile durch Lösungsmittel und Rückführung in den früheren Kolloidzustand durch erneute Mischung mit Wasser, Salzlösungen und anderen Komponenten;



doch gelingen Trennungen solcher kolloider Substanzen durch Lösungsmittel kaum vollständig<sup>1)</sup>).

Die Synthese der Immunitätsvorgänge ist ein Unternehmen, dessen Konsequenzen jetzt noch nicht zu überblicken sind, das aber ergeben wird, inwiefern der Kolloidzustand von der chemischen Eigentümlichkeit unabhängig sein kann und inwiefern sich zeitlich und quantitativ identische Verlaufskurven zeigen. Eines ist sicher, daß der Zeitverlauf, die typische Abhängigkeit von Temperatur und die Absorptionsverhältnisse dieselben sind wie bei Kolloidvorgängen. Inwieweit das aber vollkommene Identitäten sind oder werden, ist noch nicht zu übersehen (vergl. Schluß). Es lassen sich auch nicht alle in der Literatur bis heute angegebenen synthetischen Versuche mit künstlichen Kolloidsubstanzen unter allen Umständen reproduzieren, weil die Darstellungsbedingungen nicht mit der für Kolloide nötigen Präzision und Ausführlichkeit angegeben sind.

#### **Die Membranen und ihre Beziehungen zu den Immunitätsreaktionen.**

Bis jetzt haben wir die allgemeinen Gesetzmäßigkeiten untersucht und die Auffassung an Hand der synthetischen Resultate geprüft. Nun soll hier ein Spezialgebiet der Immunität nach den Erfahrungen auf dem Gebiete der Kolloide durchgeprüft werden, nämlich die morphologisch verfolgbaren Vorgänge, bei denen strukturelle Verhältnisse verschoben werden.

Den Endeffekt vieler Vorgänge, den wir uns in einer Reihe von Gliedern vorstellen, besteht in vielen Fällen in einem Vorgang, den wir als eine Destruierung einer morphologischen Entität, mit bestimmten Grenzen, Be-

---

1) Zu den synthetischen Versuchen, die direkt aus der Kolloidtheorie sich ableiten lassen, ist die Beeinflussbarkeit der Seren durch Elektrolyte und chemisch weniger aktive dritte Stoffe und durch Verdünnung zu zählen, speziell auch, daß alle Veränderungen resp. Beeinflussungen nicht sofort den Endwert erreichen, z. B. daß die Veränderung der Seren nicht in kritischen Punkten vor sich geht, sondern daß sie sich erst nach längerer Zeit (Tagen, Wochen) sich auch auf konstante Werte einstellt.

grenzungen, Grenzschichten, Membranen, betrachten können. Für viele Vorgänge ist die Verschiebung der Membranen das Wesentliche.

Im folgenden Kapitel werden wir verschiedene Vorgänge und Veränderungen in Grenzschichten untersuchen. Als solche Tatsachen-Gruppen, für welche die Membranen charakteristisch sind, seien insbesondere besprochen: 1) Funktionen der Grenzschichten überhaupt, Vorgänge in der Membran, a) Permeabilitätsveränderungen, b) lokale Zerstörung (Opsoninwirkung, Phagocytose), c) diffuse Quellung, Auflösung (Lyse); 2) die weniger bekannten physikalischen Momente, die bei allen diesen Vorgängen die Hauptrolle spielen, und die physikalisch längst festgelegt sind. Die genannten wichtigen Vorgänge sind in ihrem inneren Wesen nichts anderes als Beobachtungen der Verschiebungen in morphologischen Strukturen. Beobachtungen dieser Art sind in der Tat der Ausgangspunkt systematischer Untersuchungen und diagnostischer Methoden geworden. Der Verlauf dieser Vorgänge beruht in einer Veränderung kolloidaler Strukturen, speziell Membranen. Die wesentlichen Vorstadien des charakteristischen Vorganges sind also kolloide Reaktionsprozesse.

Die Infektions- und Heilungsprozesse sind an Gebilde gebunden, die durch bestimmte Größen und durch scharfe Abgrenzung gegen ihre Umgebung charakterisiert sind. Der Umstand, daß es scharf begrenzte Gebilde sind, beweist schon, daß sie auch Grenzschichten enthalten, die einerseits den Substanz austausch, also Aufnahme wie Sekretion bestimmen, ebenso die charakteristische Struktur und den Zusammenhang, also die Individualität dieser Gebilde garantieren.

Diese Oberflächenschichten des Plasmas sind kolloidale Bestandteile, die nach den Kolloid- und Membrangesetzmäßigkeiten beeinflußbar sind. Solche Beeinflussungen sind:

a) Veränderung der Permeabilität der Membran: Verdichtung der Membran, Verstarrungen, Abtötung durch veränderten Stoffwechsel, damit verwandt Erhöhung und Verminderung der Permeabilität; Veränderung der Beziehung zum Milieu und zu ihresgleichen, wie die Agglutination, Ausflockung und Anpassungen.

b) Aufhebung der Zusammenhänge: Lokale Zerstörung, Auflösung der Membran (Opsonin, Phagocytose), Lösung, Verquellung der Membran als Ganzes (Lyse)<sup>1)</sup>.

Die Bekenntnis des Kolloidalcharakters läßt folgende Möglichkeiten voraussehen: es lösen sich Strukturen auf, verflüssigen sich, geben ihre Festigkeit und Elastizität in neuen Kombinationen auf, andererseits entstehen aber auch Strukturen<sup>2)</sup> (in der Präzipitation sichtbar, mit der Viskosimetrie nachweisbar), und Strukturveränderungen können zu Anpassungen werden.

Die verschiedenen Veränderungen kolloidaler Membranen, die wir heute als physikalische Vorgänge unter systematische Gesichtspunkte bringen können, sind biologisch außerordentlich verschiedenartige Erscheinungen, die speziell nach der häufigen biologisch-teleologischen Abgrenzung und Benennung durchaus keine Zusammenhänge zu haben schienen. Hierher gehören die Erscheinungen, die sich gleichzeitig mit den verschiedenen Veränderungen der Bakterien in ihren Lebensprozessen und ihrer Empfindlichkeit zeigen, wie die Veränderung der Agglutinierbarkeit, der verschiedenen Formen der Anpassung, Anpassung an die Verteidigungssubstanzen des Organismus, des Kulturbodens, Anpassung an bestimmte Tierarten durch Tierpassagen, Steigerung der Virulenz etc.

Unter diesen Gesichtspunkten vereinigen sich auch die Fälle, wo der Organismus und die Bakterien sich gegenseitig anpassen resp. sich gegenseitig abschließen (latenter Mikrobismus). Diese Art Anpassung der Grenzmembranen resp. Funktionsänderung hat manchmal einen sogar morphologisch resp. mikroskopisch verfolgbaren Ausdruck in der Verdickung der Bakterienhüllen, wie z. B. der Milzbrandbacillus im infizierten Organismus. Meist aber erfolgt die Anpassung an eine sukzessive Steigerung resp. Veränderung im Lebensmilieu,

---

1) Literatur und physikalische Ableitungen vergl. meine Arbeiten: Vierteljahrsschrift der Naturforschergesellschaft Zürich, 1906, 1907, 1908, und Ergebnisse der Physiologie, 1908; Dissertationen Frei, Stoffel, Vryburg.

2) Vergl. Nicolle, Conception générale de l'immunité. Ann. Inst. Pasteur, 1907, 1908; auch Arrhenius.

die sich in der Kultur mit verschiedenen, langsam steigenden Zusätzen gerade so verfolgen läßt, wie im Organismus.

Auch das Agglutinationsproblem kann unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden. Daß kolloidale Substanzen temporär und unter bestimmten Bedingungen aus Zellen austreten, ist bewiesen. Es gibt also eine Permeabilitätsänderung in bezug auf Kolloide.

Bei Suspension von Hefezellen treten unter den verschiedensten Bedingungen Substanzen aus, die eine Agglutination der einzelnen freien Hefezellen zur Folge haben.

Wenn wir nun annehmen müssen, daß schleimige kolloidale Substanzen unter bestimmten Bedingungen aus einzelligen Lebewesen austreten und Agglutination erzeugen können, stellt sich sofort die Frage, ob und inwieweit die Bakterienagglutination nicht eine Folge eventuell sezernierter und nicht nur exogener Kolloide sei, so daß die Fragen der Agglutination mit zu den Fragen nach der Permeabilitätsänderung der Membran in Beziehung treten würden und unter gleiche Gesichtspunkte fielen. So sollte die Frage nach dem Wesen der Agglutination auch von einem anderen Standpunkt aus gestellt werden: Ob und inwiefern hängt die Agglutination mit durch die Serumstoffe verursachten Permeabilitätsänderungen der Bakterienhüllen zusammen?

#### **Lokale Veränderungen von Membranen.**

Das Membranproblem muß bei den aktuellsten Immunitätsproblemen den Opsoninen, sicher den Hauptfaktor enthalten, denn das morphologische Kriterium ist Durchbruch durch eine Membran mit Hilfe einer Substanz. Wenn die Lösung des Bakteriums folgt, muß eine zweite Membran gelöst werden.

Mindestens müssen wir uns klar sein, daß das allein der Vorgang ist, den wir als Index messen, dem parallel wir alle Funktionen denken, daß wir bei der Verwendung der opsoninischen Vorgänge mit zwei sich folgenden, zeitlich sich bedingenden Kolloid-Membranvorgängen denken und von allem anderen, was wir auch zu supponieren geneigt sind, nichts Bestimmtes über die feineren Vorgänge wissen.

Versuchen wir den Vorgang der Opsoninwirkung bei der Phagocytose zu analysieren.

Die Phagocytose ist demnach eine in ihrem physikalischen Wesen sehr komplizierte und in mehrere zeitlich vollständige Reaktionsphasen getrennte Immunitätsreaktion, von der die Opsoninwirkung nur eine der Variablen ist, die bis heute isoliert und verfolgt worden ist.

Der ganze Vorgang besteht darin, daß Bakterien und kleine Körnchen unter Vermittlung bestimmter Substanzen die Leukocytenmembran an einer Stelle lösen. Das kleine Körperchen kann dann durch verschiedene Kräfte in Leukocyten hineingezogen werden, oder nur an ihnen haften bleiben (Milzbrand). Die Hereinbeförderung kann durch eine Substanz erfolgen, die die Oberflächenspannung beeinflußt<sup>1)</sup> (Bechhold, Zangger, Ledingham, Hectoen). Es kann aber durch das Zusammentreffen verschiedener kolloidaler Substanzen vom Bakterium und Leukocyt relativ schnell eine strukturierte Masse entstehen, die in manchen Fällen auch färberisch darstellbar ist (Gruber u. a.).

Von diesem Zustand aus, während dessen dem Bakterium noch nichts geschehen zu sein braucht, können nun eine Reihe neuer Prozesse eintreten (entweder bringen die intracellulären Substanzen das Bakterium zur Auflösung und zerstören es auch morphologisch).

In den Komplex der Veränderungen von strukturierten festen Grenzmembranen gehören in der Immunitätslehre und Bakteriologie verschiedene weitere Gruppen von Prozessen: die bekannteste ist die Auflösung der strukturierten geformten Elemente, die Lyse, die durch sehr verschiedene Mittel chemischer und rein physikalischer Art bewirkt werden kann.

Unter den physikalischen Mitteln kommen in Betracht: Stoffe, die die vorliegende strukturierte Substanz lösen, wie in einem flüssigen Lösungsmittel, oder aber die Kohäsion der einzelnen Bestandteile der Membran aufheben. Meist geschieht dies nur in einzelnen Stellen, ohne daß es zu einer kompletten Lösung kommt. Dieser Vorgang wird in der Mehrzahl der Fälle erzeugt durch Substanzen, die infolge ihrer eigenartigen Beziehung zum Wasser und Salzlösungen dauernd im kolloidalen Zustand darin vorliegen.

1) cf. Vryburg, Diss. Zürich, 1908.

Der Vorgang spielt sich dann so ab, daß sich das Kolloid in die Membran hineindrängt, deren Kohäsion aufhebt, die früher feste Substanz verflüssigt und so in Lösung zieht, wie dies bei Kolloiden häufig beobachtet wird.

Dieser Prozeß der Lysis geht nun im allgemeinen nicht in einem einfachen Milieu vor sich, sondern die so leicht veränderlichen Kolloidfunktionen werden von anderen Substanzen beeinflusst. Hierzu genügen geringe Mengen, sobald sie sich in die Oberflächen hineindrängen und so an der Grenzfläche eine relativ hohe Konzentration erzeugen.

Treten die wirksamen Substanzen in denjenigen Konzentrationen auf, die zur Auflösung, zur Verquellung, zur Vernichtung der mechanischen Festigkeit führen, dann haben wir Aufhebung der individuellen Struktur, damit des (Zell-)Individuums und dessen Vermehrungsfähigkeit (Heilung vieler Infektionen durch Auflösung).

Kommt es nicht zu einer Aufquellung und Lösung und damit zu keiner Verteilung in der Flüssigkeit, sondern bleibt die individuelle Einheit bestehen, so haben die oben erwähnten Veränderungen durch Konzentration an der Grenzfläche eine Funktionsänderung, Anpassung etc. in irgendeiner Hinsicht zur Folge, wie sie in den letzten Jahren in einer sehr großen Zahl und Variationen realisiert worden sind.

Als Beispiel der Zerstörung gleichartiger, zelliger Gebilde ist die Hämolyse am eingehendsten untersucht worden. Die verschiedenen Ursachen der Hämolyse zu kennen, hat noch einen ganz speziellen Wert, weil sie neuerdings als spezifisches Reagens in verschiedener Richtung verwandt wird.

Wenn wir von den mechanisch wirkenden Mitteln (wie Gefrierenlassen, Zerreiben, osmotischer Druck) absehen, haben wir eine Gruppe von chemisch-hämolysierenden Stoffen, wie die Alkalien, die Säuren, verseifende Agenzien, ferner fettlösende Stoffe, wie Aether, Öle, basische Farbstoffe, dann kennen wir Hämolyse durch Fettferment (Neuberg und Reichel), durch kolloide Stoffe (Kieselsäure, Lecithine, Seifen- eventuell Fettsäuren in geringen Konzentrationen <sup>1)</sup>).

1) Daß ein festes Kolloid also eine zusammenhängende Membran die typischen Eigenschaften der Abgrenzung nach den verschiedenen Richtungen aufgeben kann, ist einleuchtend. In dem Umstand, daß eine tren-

Arrhenius betont in dieser letzten Arbeit (1908), daß Löslichkeitsverschiebungen bei der Hämolyse eine Rolle spielen. Demgegenüber betone ich, daß der Kolloidalzustand als eine Spezialform der Lösung (resp. Uebergangsformen der Lösung zu Strukturen) betrachtet werden muß. In der Kolloidtheorie ist also implicite die Bedeutung der Lösungsverhältnisse enthalten. Daß es sich aber nicht um die Lösungstheorie im gewöhnlichen Sinne handelt (wo man für die quantitativen Vorgänge durch die Methoden der Gefrierpunktsbestimmung, des Dampfdruckes, der Siedepunktserhöhung, fraktionierte Kristallisation, fraktionierte Diffusion, die zur theoretischen Behandlung notwendigen Daten erhalten kann), beweist der Umstand, daß die Immunitätsvorgänge wie die Veränderung der Seren sich nicht mit diesen Methoden verfolgen lassen.

Es war deshalb gleich bei der ersten Aufstellung der Kolloidtheorie notwendig, die hier in Betracht kommenden Vorgänge mit den bekannten Tatsachen der Lösungstheorie in Beziehung zu stellen und gleichzeitig zu betonen, daß ein Fortschritt der Erkenntnis dieser Vorgänge darin liegt, die Unterschiede gegenüber den Vorgängen in reinen Lösungen festzustellen. Gerade weil die Immunitätsvorgänge sich nicht mit den Methoden, die die Basis der Lösungstheorie sind, verfolgen lassen, nicht quantitativ mit jenen Gesetzen übereinstimmen, wurde nach dem Grundsatz der Differenzierung und Analogisierung — der in den Naturwissenschaften zur Klassifizierung allgemein verwandt werden muß — nach verwandten Erscheinungsgebieten in der Physik, Chemie, Physiologie und

nende Schicht einbricht oder sich löst, ist an sich keine spezifische Einwirkung charakterisiert. Dieser Vorgang wird erst ein Maßstab für spezifische Einwirkungen, wenn alle anderen Faktoren gegeben, wenn die Wirkung nur eines bestimmten Faktors gemessen wird an der Hämolyse.

Arrhenius hat im Frühjahr 1908 eine neue Arbeit über Hämolyse publiziert (Schriften des Nobel-Institutes), in der er sich den physikalischen Vorgängen bei der Hämolyse zuwendet und deren Bedeutung als ausschlaggebend anerkennt, ohne auf die Struktur der Kolloide einzutreten. Er geht aus von alten Experimenten von Arrhenius und Madsen und von denjenigen, die von W. Frei in meinem Laboratorium gemacht worden sind, und bringt eine Reihe neuer Ideen und hämolytischer Kombinationen, die in großen Reihen weiter quantitativ wiederholt zu werden verdienen.

Technik gesucht, und überall stellte sich als wesensverwandt die große Gruppe der Kolloide ein.

Speziell treten die Kolloideigenschaften dann in den Vordergrund, wenn es sich um feste strukturierte Gebilde handelt (in den verschiedenen Quellungsstadien), wie sie in den Grenzgeschichten der Mikroorganismen und anderen Zellen vorliegen.

Die Bakterienmembran kann noch in mancher Richtung verändert werden. Sie kann als Kolloid elektrisch entgegengesetzt geladene Kolloide absorbieren, speziell die Metallhydroxyde, wie sie bei einer Reihe der früher verwandten Desinfizienzien wirksam sind (Kupfer und Eisensalze).

Die Membran kann substantiell dadurch verändert werden, daß sich auf ihr Substanzen niederschlagen (analog wie die Präzipitine). Ich habe in der letzten Arbeit schon darauf hingewiesen, daß der Heilungsprozeß durch Abkapselung ein Kolloidprozeß sein dürfte, analog der Präzipitinbildung in vitro.

Er beruht also auf einer Kombination von zwei sich ausfüllenden Kolloiden, den körperfremden Bakteriensubstanzen und den Reaktionssubstanzen des Körpers auf diese. Diese Präzipitierung bedeutet die Entstehung einer neuen Verbindung dieser zwei Stoffe, die sich vom flüssigen beweglichen Milieu abtrennen und sich sekundär zu Strukturen zusammenordnen, die nach der Erfahrung der letzten Zeit die Eigenschaften bekommen, durch Fermente, selbst durch Bakterien sehr schwer aufgelöst und verflüssigt zu werden.

Die Bakterien haben einen durch ihre Hüllen geregelten und charakterisierten Austausch.

Wir haben also gesehen, daß diese Hüllen sich verändern können, sogar morphologisch sichtbar wie beim Milzbrand, sicher aber auch funktionell bei Züchtung der Bakterien auf verschiedenen Nährboden und Veränderung der Virulenz.

Diese gerade in den letzten Jahren gut ausgebaute Tatsachenreihe zeigt die Kolloideigentümlichkeiten, speziell der festen strukturierten Massen, wie es eben Bakterien und Körperzellen sind, in ganz neuer Bedeutung und beweist eigentlich, daß wir erst im Anfang sind und noch viele Konsequenzen des Kolloidzustandes zu erwarten haben.



Wir haben eben in den Strukturen eine viel größere Zahl von realisierbaren Möglichkeiten der Anpassung und Strukturierung, resp. verschiedene Abstufungen des einen Prozesses (auch verschiedene Arten von Prozessen), die zu demselben analogen biologischen Effekt führen (Heilung, Zerstörung der Bakterien, Abkapselung), als wir uns nach den gewöhnlichen (physikalischen) Vorstellungen der Verhältnisse von fest und flüssig denken können.

Die langsamen Uebergänge von flüssig zu fest, resp. zu den Strukturen wurden sonst in der Wissenschaft wenig beachtet, bei gewöhnlichen chemischen Arbeiten trachtet man mit Hilfe von Lösungsmitteln Gleichgewichte zu schaffen und die bearbeiteten Substanzen entweder vollständig im festen oder im flüssigen Zustand zu erhalten. Hingegen kennen wir keine biologischen Prozesse, die nicht an das Kolloidmilieu gebunden wären.

Aus dem bis jetzt Besprochenen soll hervorgehen, daß wir diese verschiedenen Formen der Uebergänge von flüssig zu fest untersuchen müssen, und biologisch interessiert uns speziell das Problem der Entstehung fester Schichten, die zur Membranbildung, Membranzerstörung und Membranveränderung in den Organismen führt.

Was für Entdeckungen, und welche Erklärungen früher unbekannter Zusammenhänge sind direkt oder indirekt als Folgen der Kolloidtheorie der Immunität zu betrachten?

Vor allen Dingen sind eine große Zahl von Experimenten ausgeführt worden, durch die neue Resultate zutage gefördert worden, die eine rein chemische Betrachtungsweise gar nicht voraussehen ließen, sie sind zum Teil in dieser Arbeit angeführt worden. Speziell möchte ich darauf aufmerksam machen, daß die Kolloidtheorie uns eine große Zahl der die Experimente störenden Momente heute von vornherein voraussehen, die Empfindlichkeit verschiedener Methoden abschätzen läßt und eine Reihe von Mißerfolgen direkt als prinzipielle Folge des Kolloidzustandes erklären läßt.

Vor allem hat die Kolloidtheorie ganz andere quantitative Vorstellungen, die über die heutigen chemischen Vorstellungen hinausgehen, als entscheidend hingestellt; die Bedeutung dieses einen Zusammenhanges für die pathologischen Prozesse ist einleuchtend, wenn man bedenkt, daß die quantitative Ver-

schiebung der Vorgänge das Wesentliche in allen pathologischen Prozessen ist.

Wir haben durch die Feststellung, daß der Kolloidzustand ein integrierendes Merkmal der Immunkörper ist, auch weitere Möglichkeiten, der Spezifität nachzugehen, als die ausschließlich strukturchemischen Vorstellungen uns gestatten würden.

Der Kolloidzustand bringt weiterhin eine graduelle Abstufbarkeit der Eigenschaften mit sich, die nach mehreren Richtungen möglich ist, von diesen sind bisher die Absorptionswirkung und die elektrischen Ladungen, die im animalen Sätemilieu immer vorhanden sind, als die nächstliegenden untersucht worden.

Es gibt hier wie bei den Kolloiden keine Reaktion, wo nicht der Zeitfaktor eine absolut wesentliche Rolle spielen würde.

Eine Tendenz nach neuen umfassenderen Begriffen macht sich in der Immunität überall geltend. Man sucht speziell die lokale und allgemeine Empfindlichkeit gegen Toxine und gegen Bakterien näher zu definieren und umfassendere Analogien zu finden.

Metschnikoff spricht allgemein von lokalen Immunitäten, andere, wie Calmette und Citron, gehen einen Schritt weiter in der Lokalisation und sprechen von histogenen Immunitäten. Sauerbeck und Eisenberg sprechen von strukturellen Anpassungen, Adaptationsimmunität. Alles drängt strukturellen Erklärungen zu. Man sucht Zustände, die mehr als die gewöhnlichen chemischen abstufbar sind. Es braucht kaum darauf hingewiesen zu werden, daß der einzige alle diese Vorgänge umfassende Begriff in der Vorstellung kolloidaler Strukturen zu suchen ist.

Alle uns hier interessierenden Prozesse stammen eben in ihren wesentlichen Komponenten von lebenden Wesen ab und bringen also kolloidale neben chemischen Eigenarten mit sich. Ihr Zustand und ihre Reaktionsfähigkeit ist daher eine Funktion des Milieus im weitgehendsten Sinne. Diese Beziehungen von Milieu und den reagierenden Stoffen leiten die Konkurrenz der verschiedenen Prozesse; durch ihre Beeinflussung läßt sich der ganze Verlauf verschieben.

Die Kolloidtheorie der Immunität verbindet so und umfaßt die phänomenologisch so differenten Vorgänge des ganzen Immunitätsgebietes (von der Toxin-Antitoxinreaktion bis zur

Fällung, Agglutination, Opsonisierung, Phagocytose, Lyse). Das gemeinsam Verbindende, vom Auftreten der einfachen Substanzen in kolloidaler Form im Lösungsmittel Wasser oder Serum bis zur Strukturierung der kolloidalen Substanzen, andererseits bis zur Zerstörung der kolloidalen Struktur, alles liegt im Geltungsbereich der Gesetze des Kolloidzustandes.

### **Zusammenfassung.**

Diese Arbeit sucht nachzuweisen, daß die Vorgänge, die wir unter dem Begriff der Immunitätsreaktionen zusammenfassen, aus einer Reihe sich bedingender Sonderreaktionen bestehen, deren quantitativer, zeitlicher Verlauf für gewöhnlich beherrscht wird durch Eigenschaften der beteiligten Substanzen, die sich nicht durch die Vorstellungen der heutigen reinen Chemie, noch auch durch die Gesetze der physikalischen Chemie erklären lassen, soweit diese sich auf Lösungen und Gleichgewichte beziehen.

Es wird speziell nachgewiesen, daß der Kolloidzustand den so äußerst wichtigen quantitativen Verlauf der Immunitätsreaktionen bedingt. Die Grundlage der Diskussion bildet die Analyse einer Reihe bekannter Beobachtungstatsachen, dann die Interpretation der synthetischen Versuche mit kolloiden Stoffen, sowie der Veränderungen der Eigenschaften dieser Körper durch Beeinflussung ihres Kolloidzustandes.

Wenn auch stereochemische Eigenarten bei diesen Körpern festgestellt werden, die ja existieren müssen, bleibt wegen der eigenartigen Größenordnung und der physikalischen Strukturierung der Bestandteile die Kolloidtheorie der Immunität doch als wesentlich bestehen, weil sie imstande ist, die Eigenart der einleitenden Vorgänge und des zeitlichen Verlaufes zu definieren.

In einem zweiten Teil werden die Beziehungen der Grenzschichten und der kolloidalen Membranen in ihrer Bedeutung für die Immunitätsreaktionen behandelt von neuen physikalisch-chemischen Gesichtspunkten aus: Die Opsoninwirkung und die Phagocytose, die Agglutination und die Lyse und die vielen Anpassungserscheinungen werden als Spezialformen des Membranproblems charakterisiert, das ja seinerseits in erster Linie die Physik der Grenzflächenprobleme und der festen, schichtförmig ausgedehnten Kolloide umfaßt.

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Prof. R. Paltauf.]

**Ueber Immunisierung mit Kot und über das Verhalten des  
Inhaltes verschiedener Darmpartieen gegen Kotpräzipitin  
und Serumpräzipitin.**

**Erste Mitteilung.**

**Von Dr. M. Wilenko.**

Es liegen bis heute nur einzelne Arbeiten vor, welche es versucht haben, mittels Sekrete und Exkrete Präzipitine zu gewinnen. So injizierte Zülzer eiweißhaltigen Harn Kaninchen, das gewonnene Serum gab spezifische Niederschläge sowohl im Menschenserum, wie auch im eiweißhaltigen Harn. Leclainche und Vallée bekamen mittels Menschenharnserums Niederschläge in eiweißhaltigem, jedoch nicht in eiweißfreiem Harn. Mertens konnte mit homologem Immunserum in eiweißhaltigem Harn Niederschläge bekommen; die Reaktion verlief jedoch in abgeschwächtem Maße, was er auf den geringen Eiweißgehalt des Harnes zurückführt. Landsteiner und v. Eisler haben durch Injektionen chemisch eiweißfreien Harnes ein spezifisches Präzipitin bekommen; das gewonnene Serum gab Niederschläge am stärksten in dem zur Immunisierung verwendeten Harn; im Menschenserum bekamen sie schwache Trübung oder keine Reaktion. Ueber die Herkunft des antigenen Stoffes im Harn herrscht bis jetzt noch keine Einigkeit. Zülzer glaubt auf Grund seiner oben angeführten Versuche berechtigt zu sein, den Schluß zu ziehen, daß wenigstens die im Blut und Eiweißharn vorkommende Eiweißart identisch sei. Mertens u. a. schließen sich dieser Meinung an; dagegen Landsteiner und Eisler widersprechen der Identifizität des Serum- und Harn-eiweißes. Noch weniger als Harn war Kot — Gegenstand der Untersuchung. Biondi bekam mit homologem Serumimmunserum leichte Trübung in Kotextrakten.

Der erste, der mit Kot zu immunisieren versucht hat, war Brezina; er stellte hauptsächlich Versuche mit Hundekot und nur zum Teil mit Menschenkot an; er kam zu folgenden Resultaten: 1) die Kotimmunsera reagieren spezifisch mit

dem Kote homologer Tierarten, in quantitativ gleicher Weise höchstens mit dem Kotextrakte verwandter Tiere (z. B. Hundekotimmunserum mit Kotextrakten des Wolfes und des Fuchses; 2) die Nahrung ist für den Versuch bedeutungslos, da im Kot nur arteigenes Eiweiß vorhanden ist; 3) die Reaktion von Serumimmunserum auf Kotextrakte und reziprok ist sehr schwach; er schreibt es vielleicht einer anderen Zustandsspezifität des Koteiweißes zu. Fürstenberg bestätigt die Versuche Brezinas; auch ihm ist es gelungen, spezifische Kotimmunsera zu gewinnen. — Angeregt durch Herrn Prof. Kraus, stellte ich biologische Versuche vor allem mit Menschenkotextrakten aus verschiedenen Darmpartien an, um deren Verhalten in bezug auf präzipitinogene Eigenschaften kennen zu lernen. Die Methode der Vorbereitung des Kotextraktes mußte ich im Laufe der Arbeit ändern. Anfangs war die Methode folgende: Frischer, normaler Menschenkot wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:7 versetzt, gut zerrieben und 12 Stunden im Eisschrank gelassen; dann  $\frac{3}{4}$ —1 Stunde zentrifugiert; die Masse teilte sich in zwei scharf voneinander abgegrenzte Schichten, in eine obere, gleichmäßige Emulsion und eine untere, aus gröberen Partikelchen bestehende Masse; die obere Schichte wurde abpipettiert und auf zweifache Weise behandelt: 1) ein Teil wurde — ähnlich wie bei Brezina — durch Filtrierpapier und Chamberlandfilter filtriert; ich bekam eine klare, dunkelbraune Flüssigkeit; 2) der zweite Teil wurde in dünnen Schichten à 1,5 ccm in Petrischalen ausgegossen, 24 Stunden bei 37° getrocknet, dann in derselben Menge Kochsalzlösung gelöst, zentrifugiert, mit Karbolsäure (entsprechend 0,5 Proz.) versetzt und geschüttelt. Das Filtrat sub 1) brachte zwar die Tiere nicht um, jedoch konnte ich nach 5 Injektionen kein wirksames Serum bekommen; auch die zweite Behandlungsart schlug fehl. Am günstigsten hat sich folgende Methode erwiesen: die Emulsion, auf oben beschriebene Weise erhalten, wurde mit Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt; mit diesem Extrakt gelang es mir, Kaninchen zu immunisieren und ein kräftig wirkendes Serum zu bekommen. Schon nach 3 Injektionen (10—12 ccm) habe ich von allen Tieren, die am Leben geblieben sind, ein Serum gewonnen, das in Mengen

von Verdünnungen des Kotextraktes bis 1:30 Niederschläge gab; nach weiteren Injektionen konnte ich eine Erweiterung — wenn auch nicht immer — der Reaktionsbreite beobachten.

1. Versuch a) 2 ccm Kotfiltrat + 0,5 ccm Menschenkots-  
serum — keine Trübung; nur einmal bemerkte ich eine  
sehr schwache Trübung.

2. Versuch b) 2 ccm Kotemulsion + 0,5 ccm Menschenkots-  
serum — reichlicher Niederschlag in der Verdünnung 1:5,  
1:10, 1:30.

Als Kontrolle diente: Kotemulsion + 0,5 ccm physio-  
logischer Kochsalzlösung, oft Emulsion + normales Kaninchen-  
serum; die Kontrollflüssigkeit blieb homogen. Die Beobachtungs-  
dauer betrug 2 Stunden Brütöfen und 20 Stunden Zimmertem-  
peratur, da sich der Niederschlag nur allmählich bildete. In  
weiteren Versuchen habe ich mich nur der Emulsion bedient.  
Als positives Resultat wurde der Versuch betrachtet, wenn  
sich ein Niederschlag gebildet hat.

Das Kotimmunserum reagiert, wie aus weiteren Versuchen  
hervorgeht, am stärksten auf Menschenkotextrakt; Spuren  
von Niederschlägen waren in Affenkot, Ziegenkot und Hunde-  
kot, dagegen nicht in Pferdekot zu sehen. Auch Nahrungs-  
eiweiß konnte ich einmal mittels spezifischer Sera  
(Rinderimmunserum und Laktoserum) nachweisen.

Weitere Versuche betrafen das Verhalten des Kotimmun-  
serums gegen Menschenserum und Menschenserum-Immun-  
serums gegen homologen Kotextrakt. Nach Ausfall der Ver-  
suche zeigt sich, daß Menschenimmunserum von der Stärke  
1:15 000 Spuren von Niederschlag im Menschenkotextrakt er-  
geben hat, Kotimmunserum erzeugt in Menschenserum nur  
leichte Trübung.

Es war noch die Frage über die Herkunft der spezifischen  
Antigene im Kote zu lösen. Zur Lösung dieser Frage ging  
ich folgendermaßen vor: ich habe Inhalt der Darmabschnitte  
von Menschenleichen (keine Darmerkrankungen) untersucht  
und das Verhalten des Extraktes verschiedener Darmpartien  
gegen Menschenimmunserum und Kotimmunserum geprüft.  
Die Versuchstechnik war folgende: die Oberfläche des unter-  
bundenen Darmabschnittes wurde mit einem glühenden Messer  
abgebrannt, dann mit einer ausgekochten Schere aufgeschnitten

und vorsichtig, ohne die Schleimhaut zu berühren, der Inhalt herausgenommen, weitere Behandlung des Inhalts erfolgte in der beschriebenen Weise. Versuch: 2 cm<sup>3</sup> Extrakt + 0,5 Serum.

Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	S Rom.	norm. Kot	Menschen- kot- Imm.-Serum	Menschen- serum Imm.-Serum	Niederschlag
+	.	.	.	.	.	.	+	.	kaum merklicher
+	.	.	.	.	.	.	+	+	starker
.	+	.	.	.	.	.	+	+	Spuren
.	.	+	.	.	.	.	+	+	starker
.	.	.	.	.	.	.	+	+	Spuren
.	.	+	.	.	.	.	+	+	starker
.	.	.	+	.	.	.	+	+	deutlicher
.	.	.	+	.	.	.	+	+	Spuren
.	.	.	.	.	+	.	+	+	reichlicher
.	.	.	.	.	+	.	+	+	Spuren
.	.	.	.	.	.	+	+	.	starker
.	.	.	.	.	+	+	+	+	Spuren

(Mit Laktoserum [Kuh] und Rinderimmunserum habe ich mehrmals Spuren von Niederschlägen beobachtet [Knöpfelmacher].) Die Reaktion mit Menschenkotserum und Menschenserum-Immunserum scheint aus folgenden Gründen von eventuellen Eiweißspuren der Nahrung unabhängig sein.

1) Bei Vorhandensein von Rindereiweiß hätte das Menschenimmunserum das Nahrungsprotein nicht ausgefällt. 2) Laktoserum und Rinderimmunserum gibt in den positiven Fällen Spuren von Niederschlägen in allen Darmabschnitten, während Menschenimmunserum in den tiefer gelegenen Darmpartien immer schwächere Reaktion zeigt. 3) Zugleich gibt Kotimmunserum die stärkste Reaktion im Kot nach der Defäkation. Wovon ist nun die Abschwächung der Reaktion mit Menschenimmunserum im Dickdarm und stärkeres Auftreten der Reaktion mit Kotimmunserum daselbst abhängig? Daß es sich um art-eigenes Menscheneiweiß im Kot handelt, habe ich schon auseinander-gesetzt.

Wie man dagegen die Reaktion mit Menschenimmunserum mit Dünndarmkoten erklären soll, läßt sich mit Sicherheit nicht entscheiden. Die von mir erzielten Resultate könnten sich vielleicht zunächst aus den Untersuchungen von Freund

erklären, der behauptet, daß arteigenes Eiweiß vom Blut in das Darmlumen ausgeschieden wird, wo der erste Abbau desselben stattfindet und von wo aus es wieder resorbiert wird. Abderhalden, Funk, London behaupteten, daß das Nahrungseiweiß vor seiner Resorption so weit abgebaut wird, daß es im Körper sofort zu körpereigenem Eiweiß aufgebaut werden kann. Dieser Aufbau erfolgt nach ihren Untersuchungen höchst wahrscheinlich direkt in der Darmwand.

Möglicherweise reagieren aber die Sekrete des Dünndarms, so wie Menschenserum. Daher vielleicht die Niederschläge mit homologem Menschenserum-Immunserum im Dünndarm.

Die starke Reaktion mit Kotimmunserum in den tiefer gelegenen Partien des Darmtractus und das negative Verhalten derselben gegenüber Serumpräzipitin und Dünndarmpräzipitin lassen vielleicht folgende Erklärung zu: Nach Obermayer und Pick soll nicht nur die Abstammung, sondern auch die durch chemisch-physikalische Eingriffe erzeugte Zustandsveränderung der Eiweißkörper bei der Präzipitinbildung von Bedeutung sein. Sie unterscheiden daher eine zweifache Spezifität: 1) die durch die Herkunft bedingte Artspezifität und 2) die durch chemiko-physikalische Einflüsse bedingte Zustandsphase oder Zustandsspezifität. Nicht ausgeschlossen wäre es daher, daß das im Darmlumen sich befindende arteigene Menscheneiweiß (die Herkunft ist allerdings bisher nicht festgestellt) teils unter dem Einfluß der Darmfermente, teils unter dem Einfluß von Bakterienprodukten im Dickdarm, in eine andere Zustandsphase übergeht, die den Unterschied im Verhalten des Dünndarmkotretraktes und Dickdarmkotretraktes bedingt.

Zuletzt wären noch die Versuche zu erwähnen, die ich mit Kotextrakten von darmkranken Erwachsenen, Kindern und mit Meconium angestellt habe, deren Fortsetzung ich mir vorbehalte. Die biologische Reaktion mit Kotextrakt verlief in allen Fällen (7) wie im Kotextrakte von normalen Faeces.

### **Schlußsätze.**

1) Menschenkotsera reagieren am stärksten mit Extrakten aus normalen Faeces; Spur von



Präzipitinreaktion tritt auch im Menschenserum auf.

2) Mit dem Inhalte aus den Darmabschnitten (Dünn- und Dickdarm) gibt Kotserum bloß schwache Präzipitinreaktion. Menschenimmunserum gibt die Präzipitinreaktion am stärksten mit dem Inhalte aus dem Dünndarm, in den tieferen Abschnitten wird sie immer schwächer. Mit Faeces reagiert Menschenimmunserum in Spuren.

#### Literatur.

- 1) Zülzer, Deutsche med. Wochenschr., 1901, No. 14.
- 2) Leclainche und Vallée, Centralbl. f. Bakt., 1901.
- 3) Mertens, Deutsche med. Wochenschr., 1901, No. 11.
- 4) Landsteiner und v. Eisler, Wiener klin. Rundsch., 1903, No. 1.
- 5) Biondi, Vierteljahresschr. f. ger. Med. u. öffentl. Gesundheitspflege Bd. 23, 1901.
- 6) Brezina, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 19.
- 7) Fürstenberg, Berliner klin. Wochenschr., 1908, No. 2.
- 8) Passini, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 49, p. 135.
- 9) Freund, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap., 1907.
- 10) Abderhalden, Funk, London, Zeitschr. f. phys. Chem., 1907.
- 11) Wilenko, Wiener klin. Wochenschr., 1908.

#### Nachtrag.

In der weiteren Arbeit, die an anderer Stelle veröffentlicht wurde (Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 48), bin ich zu folgenden Schlüssen gekommen:

1) Der Inhalt jedes einzelnen menschlichen Darmabschnittes erzeugt spezifische Präzipitine.

2) Die Präzipitinreaktion mit Faeces von Darmkranken verhält sich gewöhnlich abweichend von der Reaktion mit normalen Faeces, ohne jedoch einen einheitlichen Typus aufzuweisen; daher ist die Reaktion vorläufig zu diagnostischen Zwecken nicht verwendbar.

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Prof. R. Paltauf.]

**Ueber den Zusammenhang alkoholischer (hämolytisch,  
bakterizid wirkender) Substanzen der Organe mit den  
normalen und immunisatorisch erzeugten Antikörpern.**

Von Prof. Dr. **Fukuhara** (Osaka).

I.

**Bakterizidie der in Alkohol löslichen Organextrakte.**

Denys und Havet hatten zuerst einen Zusammenhang zwischen der bakteriziden Wirkung des Blutes und der Leukocytenmenge wahrgenommen. Buchner (1), Hahn (2), Schattenfroh (3) und Bail (4) haben bakterizide Substanzen in den Leukocyten nachgewiesen.

Manche Beobachtungen sprechen dafür, daß nicht allein in den Leukocyten derartige Stoffe vorhanden sind, sondern auch in anderen Zellen des Körpers. Hankin (5) und Christmas (6) haben einen Körper mit bakterientötenden Eigenschaften aus den Organen gewonnen. Die Forscher extrahierten den Körper mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung. Diese Angaben sind von Bitter (7) nachgeprüft worden, dem es ebenfalls gelang, aus Glyzerinauszügen von verschiedenen Organen bakterizid wirkende, aber nicht näher charakterisierte Substanzen zu erhalten.

Schattenfroh (8) fand eine nicht unbeträchtliche Hitzbeständigkeit der bakteriziden Substanzen der Leukocyten, und Bail bestätigte diesen Befund. Seither wurde die Aufmerksamkeit auf die hitzbeständigen bakteriziden, hämolytischen Bestandteile der Zelle gelenkt. Conradi (9) hat auch eine thermostabile bakterizide Substanz in Organautolysaten gefunden. Vor kurzem haben Landsteiner und Ehrlich (10) die bakterizide Wirkung der Organbestandteile auf Lipoide zurückgeführt und die Inaktivierbarkeit dieser Stoffe durch Erwärmen in eiweißhaltigen Lösungen nachgewiesen.

Wie Korschun und Morgenrot (20), Levaditi (33) sowie Landsteiner u. a. Autoren nachgewiesen haben, sind diese bakteriziden, hämolytischen Organbestandteile in Alkohol löslich.

Was aber die Antikörper anbetrifft, welche die Auflösung der Zellelemente (Bakterien, Blutkörperchen usw.) bewirken, so wissen wir, daß sie mit den Eiweißkörpern gefällt werden und in die Globulinfraktion übergeführt werden, daß sie demnach als Eiweißkörper anzusehen sind und denselben anhaften. Nun wollen wir uns mit der Frage beschäftigen, in welcher Beziehung die bakterienfeindlichen Eigenschaften der alkohol-löslichen Stoffe zu diesen Antikörpern und zur Immunität stehen.

Wir haben zuerst die bakterizide Wirkung der Organ-extrakte vieler Kaninchen wiederholt untersucht.

Die Resultate aller Versuche waren fast dieselben, wenn sich auch kleine individuelle Schwankungen zeigten. Der Kürze halber wird hier nur ein Versuchsprotokoll angeführt (Tabelle I).

Was die wässrigen Organextrakte betrifft, so wurde das zu untersuchende Organ der ausgebluteten Tiere zerschnitten und zur möglichsten Befreiung von etwa darin noch vorhandenen Blutresten in Kochsalzlösung gewaschen. Dann wurde das Organ mit Seesand zerrieben. Dem Organbrei wurde nach und nach 0,85-proz. Kochsalzlösung bis zur fünffachen Menge seines Eigengewichtes zugesetzt. Die so erhaltene Emulsion wurde einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf zentrifugiert.

Um die alkoholischen Extrakte der Organe zu bereiten, wurden die Organe von entbluteten Kaninchen mit gleichen Gewichtsmengen physiologischer Kochsalzlösung verrieben, dann mit zehnfachen Mengen von absolutem Alkohol extrahiert, filtriert und bei 37° eingedampft; der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, wieder eingedampft und nun dieser Rückstand in einer der fünffachen Menge des Ausgangsmaterials entsprechenden Bouillonmenge aufgeschwemmt. Bei der Prüfung der bakteriziden Wirkung der Alkoholextrakte wurden auch Kontrollproben gemacht, die unter sonst gleichen Bedingungen nur Rückstände der entsprechenden Mengen der Extraktionsmittel enthielten (Alkohol R.).

In eine Reihe von sterilisierten Reagenzgläsern wurde eine gewisse Menge der Extraktlösung gebracht, mit Bouillon auf 2 ccm angefüllt und mit einer bestimmten Menge Bakterienaufschwemmung ( $\frac{1}{20000}$  Oese von 24-stündiger Agarkultur) geimpft. Die Schätzung der bakteriziden Kraft wurde durch Zählung der Kolonien festgestellt, welche auf den Agarplatten gewachsen waren.

Tabelle I.

## a) Organextrakte: Milzbrandbacillen.

## Leberextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	620	500	30 000
0,5 " " "	"	580	∞
0,25 " " "	"	660	∞
0,1 " " "	"	660	∞
Kontr.-Bouillon	"	880	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	1320	1120	10 700
0,5 " " "	"	1380	11 000
0,25 " " "	"	1380	11 600
0,1 " " "	"	1900	11 600
Alkohol R.	"	2100	11 800

## Milzextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	390	580	1 700
0,5 " " "	"	580	1 810
0,25 " " "	"	600	1 810
0,1 " " "	"	630	1 800
Kontr.-B.	"	620	1 950
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	510	320	300
0,5 " " "	"	450	550
0,25 " " "	"	450	580
0,1 " " "	"	780	920
Alkohol R.	"	890	1 900

## Nierenextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	260	145	12 500
0,5 " " "	"	196	12 800
0,25 " " "	"	312	13 050
0,1 " " "	"	300	13 200
Kontr.-B.	"	350	19 720
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	320	270	1 890
0,5 " " "	"	265	2 430
0,25 " " "	"	300	2 700
0,1 " " "	"	300	2 780
Alkohol R.	"	480	4 500

## Mesenterialdrüsen.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	448	50	350
0,5 " " "	"	290	1900
0,25 " " "	"	380	2510
0,1 " " "	"	410	2650
Kontr.-B.	"	680	3800
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	480	670	3350
0,5 " " "	"	695	3900
0,25 " " "	"	700	3900
0,1 " " "	"	700	4000
Alkohol R.	"	810	4380

**Pankreasextrakt.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	660	1160	2 680
0,5 " " "	"	2000	4 350
0,25 " " "	"	2590	6 810
0,1 " " "	"	2660	12 000
Kontr.-B.	"	2320	12 000
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	482	800	4 800
0,5 " " "	"	950	4 950
0,25 " " "	"	1100	5 300
0,1 " " "	"	1410	5 300
Alkohol R.	"	1490	5 800

**Kaninchenserum.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm aktiv	540	0	0
0,5 " "	"	0	0
0,25 " "	"	0	0
0,1 " "	"	0	0
Kontr.-B.	"	780	1786
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	438	255	480
0,5 " " "	"	270	520
0,25 " " "	"	285	685
0,1 " " "	"	330	695
Alkohol R.	"	590	3080

**b) Organextrakte: Choleravibrio.**

**Leberextrakt.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	620	780	8 500
0,5 " " "	"	1380	10 000
0,25 " " "	"	1900	15 000
0,1 " " "	"	1900	15 000
Kontr.-B.	"	1820	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	670	580	5 800
0,5 " " "	"	800	7 300
0,25 " " "	"	820	7 300
0,1 " " "	"	885	10 000
Alkohol R.	"	880	∞

**Nierenextrakt.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	620	780	7 500
0,5 " " "	"	983	9 000
0,25 " " "	"	1200	9 300
0,1 " " "	"	1800	11 000
Kontr.-B.	"	1520	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	570	264	4 500
0,5 " " "	"	390	5 800
0,25 " " "	"	580	15 200
0,1 " " "	"	680	17 800
Alkohol R.	"	715	21 000

**Knochenmarkextrakte.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	620	800	3600
0,5 " " "	"	850	3600
0,25 " " "	"	950	4600
0,1 " " "	"	1740	5000
Kontr.-B.	"	1720	6100
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	850	440	5000
0,5 " " "	"	1000	7000
0,25 " " "	"	1200	∞
0,1 " " "	"	1320	∞
Alkohol R.	"	2250	∞

**Mesenterialdrüsenextrakte.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	920	1570	7000
0,5 " " "	"	2000	8200
0,25 " " "	"	2450	∞
0,1 " " "	"	2400	∞
Kontr.-B.	"	2160	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	900	2400	∞
0,5 " " "	"	3800	∞
0,25 " " "	"	4000	∞
0,1 " " "	"	3900	∞
Alkohol R.	"	4800	∞

**Pankreasextrakte.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	672	950	28 000
0,5 " " "	"	960	30 000
0,25 " " "	"	1020	30 000
0,1 " " "	"	1200	∞
Kontr.-B.	"	1940	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	780	920	∞
0,5 " " "	"	2100	∞
0,25 " " "	"	3000	∞
0,1 " " "	"	3320	∞
Alkohol R.	"	3080	∞

**Milzextrakte.**

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	670	820	3 100
0,5 " " "	"	900	3 400
0,25 " " "	"	900	3 480
0,1 " " "	"	1200	13 000
Kontr.-B.	"	1200	15 000
0,1 ccm alkoholischer Extrakt	830	550	8 400
0,5 " " "	"	590	8 000
0,25 " " "	"	1020	∞
0,1 " " "	"	1620	∞
Alkohol B.	"	2300	∞

Zusammenhang alkohol. Substanzen der Organe mit Antikörpern. 229

	Serum.		
	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm aktiv.	884	30	0
0,5 " "	"	30	0
0,25 " "	"	350	20
0,1 " "	"	1750	∞
Kontr.-B.	"	3000	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	680	2950	13 000
0,5 " " "	"	3440	∞
0,25 " " "	"	4500	∞
0,1 " " "	"	4520	∞
Alkohol R.	"	5480	∞

c) Organextrakte: Typhusbacillen.

	Leberextrakte.		
	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	880	1480	28 100
0,5 " " "	"	3040	36 400
0,25 " " "	"	3110	∞
0,1 " " "	"	3200	∞
Kontr.-B.	"	3200	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	620	276	157
0,5 " " "	"	449	178
0,25 " " "	"	1702	1 955
0,1 " " "	"	2125	2 650
Alkohol R.	"	2100	2 725

	Milzextrakte.		
	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	880	2850	19 500
0,5 " " "	"	2850	22 100
0,25 " " "	"	2900	40 500
0,1 " " "	"	2300	48 400
Kontr.-B.	"	2216	49 200
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	760	934	12 300
0,5 " " "	"	930	12 700
0,25 " " "	"	940	12 910
0,1 " " "	"	1400	13 050
Alkohol R.	"	1550	13 000

	Nierenextrakt.		
	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	960	2690	∞
0,5 " " "	"	2700	∞
0,25 " " "	"	2660	∞
0,1 " " "	"	2810	∞
Kontr.-B.	"	2718	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	880	2920	6 000
0,5 " " "	"	3200	9 000
0,25 " " "	"	3280	11 000
0,1 " " "	"	3600	∞
Alkohol R.	"	3720	∞

## Mesenterialdrüsenextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	544	2060	15 000
0,5 " " "	"	2050	15 000
0,25 " " "	"	2080	∞
0,1 " " "	"	2138	∞
Kontr.-B.	"	2160	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	650	472	4 520
0,5 " " "	"	612	6 280
0,25 " " "	"	880	8 000
0,1 " " "	"	1500	22 000
Alkohol R.	"	1512	22 000

## Pankreasextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	720	1090	3 510
0,5 " " "	"	1180	3 490
0,25 " " "	"	1100	3 580
0,1 " " "	"	1250	4 900
Kontr.-B.	"	1180	4 590
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	750	950	3 500
0,5 " " "	"	990	3 520
0,25 " " "	"	1150	4 200
0,1 " " "	"	1200	6 600
Alkohol R.	"	1200	7 980

## Knochenmarkextrakt.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	800	330	1100
0,5 " " "	"	330	5000
0,25 " " "	"	700	∞
0,1 " " "	"	800	∞
Kontr.-B.	"	1 200	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	570	4 000	4800
0,5 " " "	"	4 800	5000
0,25 " " "	"	7 000	∞
0,1 " " "	"	7 800	∞
Alkohohl R.	"	11 000	∞

## Serum.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm aktiv.	880	ϕ	ϕ
0,5 " "	"	ϕ	ϕ
0,25 " "	"	162	500
0,1 " "	"	880	4000
Kontr.-B.	"	2020	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	780	430	4 000
0,5 " " "	"	500	5 200
0,25 " " "	"	880	5 600
0,1 " " "	"	1620	11 000
Alkohol R.	"	1700	15 000

B. anthracis wurde also durch keines der wässrigen Extrakte nennenswert geschädigt. Die alkoholischen Organ-



extrakte von Pankreas und Milz zeigten nur etwas stärker bakterienvernichtende Wirkung gegen Milzbrandbacillen als wässrige. Die wässrigen und alkoholischen Extrakte von Nieren, Pankreas und Milz bewirkten keine Schädigung auf *B. typhi*. Die alkoholischen Extrakte von Mesenterialdrüsen und Leber zeigten ziemlich starke bakterizide Wirkung gegen Typhusbacillen. Bei dem wässrigen und alkoholischen Extrakte von Leber, Mesenterialdrüsen und Pankreas konnten wir keine nennenswerte bakterizide Wirkung gegen *Cholera vibrio* finden.

Es wurden nun Kaninchen mit *V. cholerae* und *B. typhi* immunisiert. Nachdem sie eine Zeitlang behandelt worden waren, wurden sie entblutet und das Serum und ihre Organe auf ihre bakteriziden Eigenschaften und deren Wert in vitro geprüft. Die bakteriziden Wirkungen der Organextrakte von immunisierten Kaninchen verhielten sich ebenso wie die von normalen, während die bakteriolytische Wirkung des Blutserums eine bedeutende Steigerung zeigte.

Wir wollen auch der Kürze halber nur ein Versuchsprotokoll hier anführen (Tabelle II).

Tabelle II.

a) Kaninchen No. 416, mit *Cholera vibrio* immunisiert.

Serum (bakterizide Minimaldosis: 0,00005 ccm in vitro).

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	700	800	16 000
0,5 " " "	"	900	∞
0,25 " " "	"	900	∞
0,1 " " "	"	950	∞
Alkohol R.	"	967	∞

#### Knochenmarkextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	700	250	500
0,5 " " "	"	600	1 200
0,25 " " "	"	700	3 800
0,1 " " "	"	1000	4 500
Kontr.-B.	"	1500	10 000
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	860	700	7 000
0,5 " " "	"	700	7 500
0,25 " " "	"	910	10 000
0,1 " " "	"	900	15 000
Alkohol R.	"	900	15 000

## Mesenterialdrüsenextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	900	900	10 000
0,5 " " "	"	1 500	11 000
0,25 " " "	"	1 500	∞
0,1 " " "	"	2 880	∞
Kontr.-B.	"	2 890	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	900	800	10 500
0,5 " " "	"	900	∞
0,25 " " "	"	930	∞
0,1 " " "	"	960	∞
Alkohol R.	"	5930	∞

## Nierenextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	900	980	8 500
0,5 " " "	"	980	10 000
0,25 " " "	"	11 000	∞
0,1 " " "	"	15 000	∞
Kontr.-R.	"	18 800	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	1180	1 200	6 000
0,5 " " "	"	2 500	6 000
0,25 " " "	"	2 500	8 200
0,1 " " "	"	3 000	12 500
Alkohol R.	"	3 600	30 800

## Milzextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
0,1 ccm wässriger Extrakt	850	900	6 300
0,5 " " "	"	1200	8 400
0,25 " " "	"	2800	19 000
0,1 " " "	"	2790	19 500
Kontr.-B.	"	3100	22 300
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	700	400	1 100
0,5 " " "	"	500	2 000
0,25 " " "	"	800	3 000
0,1 " " "	"	910	12 000
Alkohol R.	"	1200	16 000

## Leberextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	850	1100	11 700
0,5 " " "	"	1100	12 290
0,25 " " "	"	1230	11 950
0,1 " " "	"	1380	∞
Kontr.-B.	"	1300	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	900	2600	10 000
0,5 " " "	"	2800	10 900
0,25 " " "	"	3000	15 100
0,1 " " "	"	3000	15 000
Alkohol R.	"	2910	∞

## b) Kaninchen No. 410, mit Typhusbacillen immunisiert.

Serum (bakterizider Titer 0,0001 in vitro).

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	ca. 1000	800	15 000
0,5 " " "	" "	1200	22 000
0,25 " " "	" "	1200	26 000
0,01 " " "	" "	1400	∞
Alkohol R.	" "	1400	∞

## Knochenmarkextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	945	371	208
0,5 " " "	" "	415	620
0,25 " " "	" "	1000	1670
0,1 " " "	" "	1180	2000
Kontr.-B.	" "	1230	6100
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	800	810	2100
0,5 " " "	" "	810	2130
0,25 " " "	" "	960	3270
0,1 " " "	" "	1000	3480
Alkohol R.	" "	1690	6990

## Milzextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	739	290	185
0,5 " " "	" "	300	231
0,25 " " "	" "	740	830
0,1 " " "	" "	910	1 310
Kontr.-B.	" "	2090	10 680
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	820	850	10 000
0,5 " " "	" "	1160	15 000
0,25 " " "	" "	1200	17 900
0,1 " " "	" "	1390	20 350
Alkohol R.	" "	1378	∞

## Leberextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	760	1310	17 000
0,5 " " "	" "	1460	17 300
0,25 " " "	" "	1450	21 850
0,1 " " "	" "	1600	∞
Kontr.-B.	" "	1580	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	690	315	265
0,5 " " "	" "	428	810
0,25 " " "	" "	710	930
0,1 " " "	" "	860	2 170
Alkohol R.	" "	1100	4 800

## Mesenterialdrüsenextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	870	2510	15 600
0,5 " " "	"	2500	16 600
0,25 " " "	"	2620	∞
0,1 " " "	"	2910	∞
Kontr.-B.	"	2980	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	790	525	5 100
0,5 " " "	"	680	5 820
0,25 " " "	"	910	6 790
0,1 " " "	"	1590	19 600
Alkohol R.	"	1600	24 300

## Pankreasextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	870	1350	3920
0,5 " " "	"	1420	5100
0,25 " " "	"	1440	5180
0,1 " " "	"	1670	6910
Kontr.-B.	"	1700	7000
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	790	1120	4000
0,5 " " "	"	1285	4100
0,25 " " "	"	2090	6910
0,1 " " "	"	2235	8795
Alkohol R.	"	2400	8910

## Nierenextrakte.

	sofort	nach 2 Std.	nach 6 Std.
1,0 ccm wässriger Extrakt	820	2470	9 130
0,5 " " "	"	2630	10 540
0,25 " " "	"	2698	∞
0,1 " " "	"	2711	∞
Kontr.-B.	"	2735	∞
1,0 ccm alkoholischer Extrakt	768	2755	7 080
0,5 " " "	"	3060	10 100
0,25 " " "	"	3380	15 300
0,1 " " "	"	3515	∞
Alkohol R.	"	3590	∞

Wenn man die bakterizide Wirkung der wässrigen und alkohollöslichen Extrakte der Organe immunisierter Tiere mit Normalorganen vergleicht, so findet man, daß die ersteren meistens stärker bakterizid wirken als die letzteren, was bei den immunisierten Tieren nicht merkwürdig erscheint. Die alkohollösliche Substanz der Immunorgane zeigt sich jedoch in Vergleich mit jener der Normalorgane vielfach schwächer, so daß auch daraus hervorgeht, daß keine Beziehung der alkohollöslichen Körper mit den Antikörpern besteht.

Bail und Pettersson (11) haben nachgewiesen, daß im Gegensatz zu anderen Geweben und Zellen, aus Leukocyten

und dem Knochenmark mancher Tierarten auf *B. anthracis* und *Bac. proteus* sehr kräftig bakterizid wirkende Stoffe zu gewinnen sind, die ihre Wirkung namentlich dann äußern, wenn sie einem an sich unwirksamen Serum, z. B. dem von Hühnern, zugesetzt werden. Beide Forscher nehmen im Hühnerserum Immunkörper, im Knochenmark das Komplement an.

Landsteiner und Ehrlich (12) haben auch bestätigt, daß aktives oder inaktives Hühnerserum durch Beimengung von lipoiden Bestandteilen des Knochenmarkes bakterizide Eigenschaften erlangt und daß durch Erhitzen auf 58° die Wirkung von Hühnerserum und lipoiden Substanzen aufgehoben wird.

Wir haben untersucht, ob man durch das Zusammentreten von unwirksamem Serum und Organlipoid in normaler geringer Menge eine wirksame Mischung erhalten kann.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß durch Hinzufügen von Leber-, Nieren- und Knochenmarklipoid des Kaninchens zum Kaninchenserum letzteres nicht bakterizid wird (Tabelle III).

Tabelle III a.

Menge des Organlipoids	Menge des Serums inaktiv	Keimzahl	
		sofort	nach 4 Std.
1,0 ccm Nierenlipoid	1,0 ccm	28 000	∞
1,0 „ „	—	26 000	∞
1,0 „ Leberlipoid	1,0 ccm	20 000	∞
1,0 „ „	—	20 000	∞
0,25 „ Knochenmarklipoid	1,0 ccm	16 800	∞
0,25 „ „	—	17 000	∞
— „	1,0 ccm	14 500	∞

Tabelle III b.

Menge des Organlipoids	Menge des aktiven Serums	Keimzahl	
		sofort	nach 4 Std.
1,0 ccm Nierenlipoid	0,1	14 500	∞
1,0 „ „	—	12 000	∞
1,0 „ Leberlipoid	0,1	20 000	∞
1,0 „ „	—	20 000	∞
0,25 „ Knochenmarklipoid	0,1	18 900	∞
0,25 „ „	—	16 210	∞
— „	0,1	15 600	∞

Wie hier ersichtlich ist, erhält man selbst dann keine komplettierende Wirkung der alkohollöslichen Substanzen,

wenn man auch zu einer gewissen Menge aktiven Normalserums solche Substanzen von Kaninchenleber, -nieren und -knochenmark hinzufügt.

## II.

### Hämolytische Wirkung der in Alkohol löslichen Organextrakte.

Metschnikoff (16) hat die Hypothese aufgestellt, daß die hämolytische Substanz von den mononukleären Leukocyten herstamme, die bakterizide vorwiegend von den polynukleären. Tarassewitsch (17) hat Extrakte verschiedener tierischer Organe hergestellt und auf ihre hämolytische Wirksamkeit geprüft. Er glaubt dabei gefunden zu haben, daß nur die Verdauungsdrüsen (das Pankreas) und die makrophagenreichen Organe (das Netz, die Mesenterialdrüsen, die Milz) die Fähigkeit besitzen, Blutkörperchen zu lösen. Schibajama (18) untersuchte die Einwirkung von Extrakten von Meerschweinchenorganen auf Hundeblood und erzielte Hämolyse durch Milz und Lymphdrüsen, nicht durch Knochenmark und andere Organe.

Nach Klein (19) lösten nur die Pankreasextrakte die roten Blutkörperchen konstant; in einzelnen Fällen löste sie auch der Extrakt der Niere und der Darmschleimhaut.

Korschun und Morgenroth (20) haben bestätigt, daß die hämolytische Substanz des Organextraktes koktostabil, in Alkohol löslich, nicht komplex und nicht zur Antikörperbildung befähigt sei. Wölfel (21) erhielt auch aus Serum einen alkohollöslichen hitzebeständigen Anteil.

Landsteiner und seine Mitarbeiter haben sich mit der hämolytischen Wirkung von Organextrakten beschäftigt und glauben annehmen zu können, daß die hitzebeständigen hämolysierenden Stoffe dieser Extrakte den Lipoiden angehören. Eine solche Vermutung haben schon Kyes und Sachs (14) geäußert, und Noguchi (15) ist derselben Meinung.

Wir wollen nun untersuchen, in welcher Beziehung die lipoide hämolytische Substanz der Organe zu den künstlich erzeugten Hämolsinen steht.

Als Versuchsmaterial dienten einerseits das Serum und Organextrakte von normalen (Tabelle IV), andererseits die

von immunisierten Kaninchen (Tabelle V), welche letztere mit Ziegenblutkörperchen vorbehandelt worden waren.

Die Organextrakte wurden in der Weise dargestellt, wie schon oben angeführt wurde.

Tabelle IV.

1 ccm 5-proz. Blutaufschwemmung.

## Mesenterialdrüsen : Kaninchenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25 "	fast komplett	"	fast komplett	"
0,1 "	"	teilweise	ø	teilweise
0,05 "	stark	Spur	ø	stark
0,01 "	ø	ø	ø	ø

## Mesenterialdrüsen : Ziegenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 3	No. 4	No. 4	No. 3
0,5 ccm	komplett	teilweise	komplett	komplett
0,25 "	fast komplett	"	teilweise	teilweise
0,1 "	ø	"	ø	ø
0,05 "	ø	ø	ø	ø
0,01 "	ø	ø	ø	ø

## Mesenterialdrüsen : Hammelblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 5	No. 6	No. 5	No. 6
0,5 ccm	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25 "	fast komplett	teilweise	teilweise	"
0,1 "	"	spur	Spur	teilweise
0,05 "	Spur	ø	ø	Spur
0,01 "	ø	ø	ø	ø

## Pankreas : Kaninchenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	komplett	komplett	komplett	stark
0,25 "	"	"	teilweise	Spur
0,1 "	"	fast komplett	ø	ø
0,05 "	teilweise	Spur	ø	ø
0,01 "	ø	ø	ø	0

## Pankreas : Ziegenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 3	No. 4	No. 3	No. 4
0,5 ccm	komplett	Spur	teilweise	ø
0,25 "	fast komplett	ø	ø	ø
0,1 "	"	ø	ø	ø
0,05 "	teilweise	ø	ø	ø
0,01 "	Spur	ø	ø	ø

16\*

## Pankreas : Hammelblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 5		No. 5	
0,5 ccm	komplett	—	teilweise	—
0,25 "	"	—	"	—
0,1 "	"	—	Spur	—
0,05 "	stark	—	ø	—
0,01 "	ø	—	ø	—

## Milz : Kaninchenblut.]

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1		No. 1	
0,5 ccm	Spur		ø	
0,25 "	ø		ø	
0,1 "	ø		ø	
0,05 "	ø		ø	
0,01 "	ø		ø	

## Milz : Ziegenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	Spur	ø	ø	—
0,25 "	ø	ø	ø	—
0,1 "	ø	ø	ø	—
0,05 "	ø	ø	ø	—
0,01 "	ø	ø	ø	—

## Milz : Hammelblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 3	No. 4	No. 3	No. 4
0,5 ccm	ø	ø	ø	ø
0,25 "	ø	ø	ø	ø
0,1 "	ø	ø	ø	ø
0,05 "	ø	ø	ø	ø
0,01 "	ø	ø	ø	ø

## Knochenmark : Kaninchenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	ø	Spur	ø	Kuppe
0,25 "	ø	ø	ø	ø
0,1 "	ø	ø	ø	ø
0,05 "	ø	ø	ø	ø
0,01 "	ø	ø	ø	ø

## Knochenmark : Ziegenblut.

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	stark	Spürchen	Spur	ø
0,25 "	"	"	ø	ø
0,1 "	Spur	ø	ø	ø
0,05 "	ø	ø	ø	ø
0,01 "	ø	ø	ø	ø



**Knochenmark : Ziegenblut.**

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 3	No. 4	No. 3	No. 4
0,5 ccm	Kuppe	0	0	0
0,25 "	"	0	0	0
0,1 "	0	0	0	0
0,05 "	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0

**Leberextrakt : Kaninchenblut.**

Menge des Extraktes	wässriger Extrakt		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	0	0	0	0
0,25 "	0	0	0	0
0,1 "	0	0	0	0
0,05 "	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0

**Leberextrakt : Ziegenblut.**

Keine Hämolyse.

**Leberextrakt : Hammelblut.**

Keine Hämolyse.

**Nierenextrakt : Kaninchenblut.**

" : Ziegenblut.  
" : Hammelblut.

Keine Hämolyse.

**Kaninchenserum : Kaninchenblut.**

Menge	aktives Serum		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	0	0	0	0
0,25 "	0	0	0	0
0,1 "	0	0	0	0
0,5 "	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0

**Kaninchenserum : Ziegenblut.**

Menge	aktives Serum		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	komplett	komplett	0	0
0,25 "	teilweise	teilweise	0	0
0,1 "	"	"	0	0
0,05 "	"	"	0	0
0,01 "	0	0	0	0

**Kaninchenserum : Hammelblut.**

Menge	aktives Serum		alkoholischer Extrakt	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
0,5 ccm	komplett	teilweise	0	0
0,25 "	"	Spur	0	0
0,1 "	Spur	0	0	0
0,5 "	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0

Fassen wir das Ergebnis dieser Versuche zusammen, so finden wir, daß die wässerigen und alkoholischen Extrakte aus Kaninchenleber, -niere, -knochenmark und -milz fast unwirksam waren, während die aus Pankreas und Mesenterialdrüsen meistens gegen alle untersuchten Blutsorten mehr oder weniger wirksam waren.

Drei Kaninchen, die mit subkutanen Injektionen des Ziegenblutes vorbehandelt worden waren, wurden durch Verbluten getötet und die Organe in der angegebenen Weise verarbeitet.

Tabelle V.

		Lösende Minimaldosis gegen Ziegenblutkörperchen
K. No.	450	0,0005 ccm
„ „	451	0,00001 „
„ „	48	0,0002 „
1. Serumextrakt : Kaninchenblut.		
„		: Ziegenblut.
„		: Hammelblut.

Die alkoholischen Serumextrakte aller immunisierten Kaninchen zeigten keine hämolytischen Wirkungen.

## 2. Leberextrakt.

## 3. Nierenextrakt.

Die Extrakte aus der Leber und Nieren von den drei immunisierten Kaninchen wirkten nicht lösend auf das Kaninchen-, Ziegen- und Hammelblut.

## 4. Milzextrakte.

## a) Wässrige Extrakte.

Menge des Extraktes	Kaninchenblut			Ziegenblut			Hammelblut		
	450	451	48	450	451	48	450	451	48
0,5 ccm	teilw.	0	0	teilw.	0	0	0	0	0
0,25 „	0	0	0	Spur	0	0	0	0	0
0,1 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## b) Alkoholische Extrakte.

0,5 ccm	Spur	0	0	Spur	0	0	0	0	0
0,25 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 „	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 5. Knochenmark.

## a) Wässrige Extrakte.

Menge des Extraktes	Kaninchenblut			Ziegenblut			Hammelblut		
	450	451	48	450	451	48	450	451	48
0,5 ccm	Kuppe	0	Spur	Spur	Spur	0	0	0	0
0,25 "	0	0	"	0	0	0	0	0	0
0,1 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## b) Alkoholische Extrakte.

0,5 ccm	Spur	0	0	stark, Kuppe	0	0	0	0	0
0,25 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 6. Mesenterialdrüsen.

## a) Wässrige Extrakte.

Menge des Ex- traktes	Kaninchenblut			Ziegenblut			Hammelblut		
	450	451	48	450	451	48	450	451	48
0,5 ccm	kompl.	kompl.	fast kpl.	kompl.	kompl.	teilw.	kompl.	kompl.	kompl.
0,25 "	teilw.	"	"	fast kpl.	"	"	teilw.	"	fast kpl.
0,1 "	0	Spur	teilw.	0	stark	"	Spur	teilw.	"
0,05 "	0	0	"	0	Spur	0	"	Spur	stark
0,01 "	0	0	0	0	"	0	0	0	Spur

## b) Alkoholische Extrakte.

0,5 ccm	kompl.	kompl.	teilw.	kompl.	kompl.	teilw.	kompl.	teilw.	kompl.
0,25 "	teilw.	teilw.	"	"	Spur	Spur	teilw.	Spur	teilw.
0,1 "	0	0	"	0	Spur	Spur	Spur	Spur	stark
0,05 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 "	0	0	0	0	0	"	0	0	0

## 7. Pankreas.

## a) Wässrige Extrakte.

Menge des Ex- traktes	Kaninchenblut			Ziegenblut			Hammelblut		
	450	451	48	450	451	48	450	451	48
0,25 ccm	kompl.	kompl.	fast kpl.	fast kpl.	teilw.	kompl.	kompl.	teilw.	kompl.
0,1 "	teilw.	"	"	Spur	"	"	teilw.	"	"
0,05 "	Spur	stark	teilw.	0	Spur	teilw.	"	stark	stark
0,01 "	0	0	Spur	0	0	Spur	0	Spur	0

## b) Alkoholische Extrakte.

0,25 ccm	teilw.	kompl.	teilw.	teilw.	teilw.	kompl.	teilw.	teilw.	fast kpl.
0,1 "	Spur	teilw.	"	Spur	Spur	teilw.	"	Spur	teilw.
0,05 "	0	Spur	Spur	0	0	0	Spur	0	0
0,01 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Wenn wir obige Tabelle mit der IV. vergleichen, so können wir keine nennenswerte Vermehrung des alkohol-löslichen Organhämolysins bei immunisierten Tieren nachweisen, gegenüber Extrakten normaler Organe.

### III.

Verdauungsfermente vermögen alkohollösliche hämolytische Substanzen nicht zu vernichten, wie die folgende Tabelle zeigt. Sie wurden mit Pepsinsalzsäure und Trypsin geprüft. Die wässerigen Organextrakte wurden mit dem gleichen Volumen einer  $\frac{1}{4}$ -Normalsalzsäure und der entsprechenden Pepsinmenge, ferner mit dem gleichen Volumen einer 0,8-proz. Sodalösung und Trypsin, eine Kontrollprobe mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, neutralisiert und dann auf Hämolyse geprüft.

Tabelle VI.

#### a) Pankreasextrakte: Kaninchenblut.

Menge der Extrakte	Kontrolle	mit Pepsinsalzsäure behandelt nach 8 Std.	nach 24 Std.
1,0 ccm	komplett	komplett	komplett
0,5 "	teilweise	teilweise	teilweise
0,2 "	"	"	stark
0,1 "	Spur	Spur	Spur

#### b) Mesenterialdrüsenextrakte: Kaninchenblut.

Menge der Extrakte	Kontrolle	mit Pepsinsalzsäure behandelt nach 8 Std.	nach 24 Std.
1,0 ccm	komplett	komplett	komplett
0,5 "	teilweise	teilweise	teilweise
0,2 "	"	"	"
0,1 "	stark	stark	stark

#### c) Pankreasextrakte.

Menge der Extrakte	Kontrolle	mit Trypsin behandelt nach 8 Std.	nach 24 Std.
1,0 ccm	komplett	komplett	komplett
0,5 "	teilweise	teilweise	teilweise
0,2 "	"	"	"
0,1 "	Spur	Spur	Spur

#### d) Mesenterialdrüsenextrakte.

Menge der Extrakte	Kontrolle	mit Trypsin behandelt nach 8 Std.	nach 24 Std.
1,0 ccm	komplett	komplett	komplett
0,5 "	"	"	"
0,2 "	teilweise	teilweise	teilweise
0,1 "	Spur	Spur	Spürchen

Noguchi nahm an, daß die bakterizide und hämolytische Wirkung der Organextrakte teilweise durch den in Aether nicht löslichen Teil, die Seifen, hervorgerufen wird. Im Anschluß an diese Beobachtung haben wir die alkoholischen Extrakte des Serums und der einzelnen Organe von Kaninchen mit Aether ausgezogen und die hämolytische Wirkung der Aetherextrakte und des Aetherrückstandes untersucht (Tabelle VII). Aber wir konnten kein nennenswertes hämolytisches Vermögen des in Aether nicht löslichen Teiles finden.

Tabelle VII.

Alkoholische Organextrakte, mit Aether behandelt.

	ccm	Blutserum		Leber		Niere		Mesenterialdrüsen		Pankreas	
		Ex-trakt	Rück-stand	Ex-trakt	Rück-stand	Ex-trakt	Rück-stand	Ex-trakt	Rück-stand	Ex-trakt	Rück-stand
Meerschweinchenblut	1,0	0	0		0	0	0	kompl.	0	kompl.	0
	0,5	0	0		0	0	0	"	0	teilw.	0
	0,25	0	0		0	0	0	"	0	Spur	0
	0,1	0	0		0	0	0	teilw.	0	0	0
Kaninchenblut	1,0	0	0	0	0	0	0	kompl.	0	teilw.	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	"	0	"	0
	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	stark K.	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ziegenblut	1,0	0	0	0	0	0	0	teilw.	0	teilw.	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	Spur	0	"	0
	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hammeblut	1,0	0	0	0	0	0	0	kompl.	0	kompl.	0
	0,5	0	0	0	0	0	0	teilw.	0	teilw.	0
	0,25	0	0	0	0	0	0	"	0	"	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	Spur	0	0	0

## IV.

Korschun und Morgenroth haben festgestellt, daß die koktostabile Substanz der normalen Sera von verschiedenen Versuchstieren (Kaninchen, Ziegen und Ochsen) die hämolytische Wirkung der Organemulsionen neutralisiert. Ich habe auch bereits früher dieselbe Substanz im Schaf- und Meerschweinschenserum gefunden.

Seitdem die Arbeiten von Ransom (22), Noguchi (23), P. Th. Müller (24), H. Sachs (25), Detre und Sellei (26), Landsteiner und v. Eisler (27), v. Pascuchi (28)

und v. Eisler (29) erschienen sind, wurde die Erforschung der antihämolytischen Wirkung der lipoiden Bestandteile des Serums zu einem interessanten Studium auf dem Gebiete der Immunitätslehre. Es schien uns also von besonderem Interesse, zu untersuchen, worauf diese antihämolytische Wirksamkeit des Normalserums beruhe, ob es sich hierbei nur um die Lipoide des Serums handle oder ob eine andere Substanz bei dieser Wirkung beteiligt wäre.

Wir haben zuerst die antihämolytische Wirkung der ätherischen Extrakte des normalen Kaninchenserums geprüft (Tabelle VIII).

Sowohl beim Mesenterialdrüsen- als auch beim Pankreasextrakt wirkte der alkoholische Extrakt des Kaninchenserums nicht hemmend.

Tabelle VIII.

Menge des alkoholischen Organextraktes	Menge des alkoholischen Serumextraktes	Hämolyse
0,25 ccm Mesenterialdrüsenextrakt	—	komplett
0,25 „ „	0,5 ccm	„
0,25 „ „	0,25 „	„
0,25 „ „	0,1 „	„
0,25 „ „	0,05 „	„
0,2 „ Pankreasextrakt	—	„
0,2 „ „	0,5 ccm	„
0,2 „ „	0,25 „	„
0,2 „ „	0,1 „	„
0,2 „ „	0,05 „	„

Es wurde die lösende Dosis des Organextraktes verwendet. Zur Prüfung auf Hämolyse wurde 1 ccm der 5-proz. Kaninchenblutlösung versetzt.

Das mit Aether extrahierte Kaninchenserum wirkte noch hemmend. Der Rückstand des Aetherextraktes zeigte keine Hemmungswirkung (Tabelle IX).

Tabelle IX.

Menge des alkoholischen Organextraktes	Menge des mit Aether extrahierten Kaninchenserums	Hämolyse
0,25 ccm Mesenterialdrüsenextrakt	—	komplett
0,25 „ „	0,5 ccm	θ
0,25 „ „	0,25 „	θ
0,25 „ „	0,1 „	fast komplett
0,25 „ „	0,05 „	komplett
0,2 „ Pankreasextrakt	—	„
0,2 „ „	0,5 ccm	θ
0,2 „ „	0,25 „	θ
0,2 „ „	0,1 „	komplett
0,2 „ „	0,05 „	„

Wir haben die nach der Alkohol- und Aetherbehandlung des Normalserums gewonnenen Filtrate abgedampft und einen Rückstand erhalten, der keine hemmende Wirkung hat. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß die hemmende Wirkung der Normalsera auf die Hämolyse durch Organemulsionen nicht mit den Lipoiden in Zusammenhang zu bringen ist. Diese Annahme wird durch folgende Versuche noch bestärkt (Tabelle X).

Tabelle X.

Menge des Organextraktes	Menge der Cholesterinzusätze <sup>1)</sup>	Hämolyse
Mesenterialdrüsen 0,25 ccm	—	komplett
„ 0,25 „	0,5 ccm	„
„ 0,25 „	0,25 „	„
Pankreas 0,2 „	—	„
„ 0,2 „	0,5 ccm	„
„ 0,2 „	0,25 „	„

Das Cholesterin zeigte also keine Schutzwirkung gegen den hämolytischen Organextrakt. Wir müssen also die schützende Substanz im Bluteiweiß suchen. Wir haben das Globulin aus normalem Kaninchenserum mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, den Niederschlag abgepreßt und in der dem Serum entsprechenden Menge Wassers gelöst. Das Albumin wurde durch vollständige Sättigung des ersten Filtrats gewonnen und in derselben Weise wie das Globulin im Wasser wieder gelöst.

Die beiden Eiweißsubstanzen des Serums wurden nun auf antihämolytische Wirkung geprüft. Das Globulin wirkte fast ebenso stark hemmend wie das ursprüngliche Serum auf Organhämolysin. Das Albumin spielt nur eine untergeordnete Rolle (Tabelle XI).

Tabelle XI.

Menge des Extraktes	Menge der Zusätze	Hämolyse
Mesenterialdrüsen 0,25 ccm	—	komplett
„ 0,25 „	Normalserum 0,5 ccm	θ
„ 0,25 „	„ 0,25 „	θ
„ 0,25 „	„ 0,1 „	Spur
„ 0,25 „	Globulin 0,5 „	θ
„ 0,25 „	„ 0,25 „	θ
„ 0,25 „	„ 0,1 „	fast komplett
„ 0,25 „	Albumin 0,5 „	Spur
„ 0,25 „	„ 0,25 „	teilweise
„ 0,25 „	„ 0,1 „	komplett

1) 1 Teil der heiß gesättigten Methylalkohollösung des Cholesterins wurde mit 19 Teilen Kochsalzlösung versetzt.

Das aus dem Kaninchenserum gewonnene Globulin und Albumin behandelten wir mit Pepsinsalzsäure. Wie die Tabelle XIII zeigt, wurde die hemmende Wirkung des Globulins und des Albumins durch die Pepsinverdauung aufgehoben.

Tabelle XII.

Menge des alkoholischen Mesenterialdrüsenextraktes	Menge des mit Pepsinsalzsäure behandelten Serumeiweißes	Hämolyse
0,25 ccm	--	komplett
0,25 "	0,5 ccm Globulin	"
0,25 "	0,25 " "	"
0,25 "	0,1 " "	"
0,25 "	0,5 " Albumin	"
0,25 "	0,25 " "	"
0,25 "	0,1 " "	"

Wie es Madsen und Noguchi (31) gelungen ist, die Verbindung Cholesterin-Saponin durch Chloroform zu sprengen, konnte v. Eisler (32) das durch Cholesterin neutralisierte Tetanolysin mit Chloroformbehandlung wieder frei machen.

Wir haben den alkoholischen Pankreasextrakt mit gleicher Menge von inaktiviertem Kaninchenserum 30 Minuten im Brutschrank gehalten und hierauf das Gemisch teils mit Aether, teils mit Alkohol behandelt. Nach dem Abdampfen der gewonnenen Extrakte wurde der Rückstand in Kochsalzlösung suspendiert. Durch diese Behandlung gelang es, die hämolytische Substanz wieder in Alkohol oder Aether aufzunehmen.

Es ist also wahrscheinlich, daß die Organhämolysine mit dem Serumeiweiß sehr locker verbunden seien.

Obwohl Korschun und Morgenroth die nicht komplexe Eigenschaft des Organhämolysins festgestellt haben, schien es mir doch von Interesse, zu untersuchen, wie sich das Bindungsvermögen dieses Hämolysins zu verschiedenen Blutsorten verhält.

Je 1 ccm 5-proz. Aufschwemmung des Kaninchen- und Hammelblutes wurden in Eis gut gekühlt, dann wurden wechselnde Mengen vorgekühlten alkoholischen Extraktes von Mesenterialdrüsen und Pankreas zugesetzt und die Gemische unter häufigen Umschütteln 2 Stunden bei 0° gehalten. Nach dem Zentrifugieren der Gemische haben wir das Sediment von neuem in Kochsalzlösung (2 ccm) aufgeschwemmt und den Abguß mit 0,05 ccm gewaschenen Blutes versetzt.



Tabelle XIII.

1,0 ccm 5-proz. Kaninchen- blutlösung +	Lösung nach 2 <sup>h</sup> : 0°	Hämolyse des Sediments	Abguß + Hammelblut
0,5 ccm Pankreasextrakt	Spur	komplett	θ
0,25 " "	θ	"	θ
0,1 " "	θ	"	θ
0,5 " Mesenterialdrüsenextrakt	θ	"	θ
0,25 " "	θ	Spur	θ
0,1 " "	θ	θ	θ
{1,0 ccm 5-proz. Hammelblut- aufschwemmung +	Lösung nach 2 <sup>h</sup> : 0°	Hämolyse des Sediments	Abguß + Kaninchenbl.
0,5 ccm Pankreasextrakt	θ	komplett	komplett
0,25 " "	θ	Spur	"
0,1 " "	θ	θ	Spur
0,5 " Mesenterialdrüsenextrakt	θ	θ	"
0,25 " "	θ	θ	"
0,1 " "	θ	θ	"

Es ist also hier bei 0° das Hämolysin vollkommen von Kaninchenblutkörperchen verankert und führt nach Zentrifugieren zur Lösung derselben in der Wärme.

Hammelblutkörperchen jedoch verbinden sich nicht vollkommen mit dem vorhandenen Hämolysin, sondern lassen einen Teil davon im Abguß frei, der vom Kaninchenblutkörperchen wieder verankert wird.

Es ist wohl anzunehmen, daß sich das Bindungsvermögen des Organhämolysins zu verschiedenen Blutsorten verschieden verhält.

## V.

**Antihämolytische Wirkungen der lipoiden Organextrakte.**

Seitdem Kraus und Clairmont (30), sowie Kraus und Lipschütz ausführlich eine ganz bedeutende antihämolytische Wirksamkeit normaler Sera und Organe nachgewiesen hatten, wurde die Aufmerksamkeit vieler Forscher auf die antihämolytischen Bestandteile der Zelle gelenkt. Noguchi (23) führte die hemmende Wirkung von Serum und Milch gegenüber der Hämolyse durch Solanin, Saponin, Agaricin und Tetanolsin auf den Cholesteringehalt dieser Flüssigkeiten zurück. Das Cholesterin ist nicht nur im Blut, sondern auch in allen Zellen, in der Lymphe etc. vorhanden. In besonders großen Mengen findet es sich im Gehirn und im Nervengewebe vor. Es ist zu erwarten, daß cholesterinreiche

Zellgewebe eine antihämolytische Eigenschaft haben. Diese Annahme führte uns dazu, folgende Versuche anzustellen.

Die einfach lösende Dosis von Saponin, Tetanolysin und Staphylosin wurde mit absteigenden Mengen der in einer 0,85-proz. Kochsalzlösung suspendierten alkoholischen Organextrakte von Kaninchen 30 Minuten im Brutofen digeriert, hierauf erfolgte der Zusatz der Kaninchenblutaufschwemmung. Die Ablesung geschah jedesmal nach zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank (Tabelle XV).

Tabelle XIV.

Menge des Giftes	Menge des alkoholischen Organextraktes	Hämolyse
0,002 ccm Staphylosin	—	komplett
0,002 „ „	1,0 ccm Leberextrakt	„
0,002 „ „	0,5 „ „	„
0,002 „ „	0,25 „ „	„
0,002 „ „	0,1 „ „	„
0,002 „ „	1,0 „ Nierenextrakt	„
0,002 „ „	0,5 „ „	„
0,002 „ „	0,25 „ „	„
0,002 „ „	0,1 „ „	„
0,002 „ „	1,0 „ Gehirnextrakt	„
0,002 „ „	0,5 „ „	„
0,002 „ „	0,25 „ „	„
0,002 „ „	0,1 „ „	„
0,003 „ Tetanolysin	1,0 „ Leberextrakt	θ
0,003 „ „	0,5 „ „	θ
0,003 „ „	0,25 „ „	teilweise
0,003 „ „	0,1 „ „	komplett
0,003 „ „	1,0 „ Nierenextrakt	θ
0,003 „ „	0,5 „ „	teilweise
0,003 „ „	0,25 „ „	komplett
0,003 „ „	0,1 „ „	„
0,003 „ „	1,0 „ Gehirnextrakt	θ
0,003 „ „	0,5 „ „	θ
0,003 „ „	0,25 „ „	Spur
0,003 „ „	0,1 „ „	komplett
0,00001 ccm Saponin	—	„
0,00001 „ „	1,0 ccm Leberextrakt	θ
0,00001 „ „	0,5 „ „	θ
0,00001 „ „	0,25 „ „	Spur
0,00001 „ „	0,1 „ „	komplett
0,00001 „ „	1,0 „ Nierenextrakt	θ
0,00001 „ „	0,5 „ „	Spur
0,00001 „ „	0,25 „ „	teilweise
0,00001 „ „	0,1 „ „	komplett
0,00001 „ „	1,0 „ Gehirnextrakt	θ
0,00001 „ „	0,5 „ „	θ
0,00001 „ „	0,25 „ „	θ
0,00001 „ „	0,1 „ „	teilweise

Die lipoiden Zellbestandteile der Kaninchenorgane hemmten also die hämolytische Wirkung des Tetanolysins und des Saponins; dagegen zeigten sie keine schützende Wirkung gegen Staphylolysin. Es zeigten also die alkoholischen Substanzen der Organe bezüglich ihrer antihämolytischen Wirkung genau dasselbe Verhalten, wie es v. Eisler (32) für die Serumlipide nachgewiesen hat.

### **Zusammenfassung.**

I. Die lipoiden bakteriziden und hämolytischen Substanzen in Organen sind nicht spezifisch. Diese Stoffe lassen keine Vermehrung in den Organen von immunisierten Tieren erkennen.

II. Durch Zusatz von lipoiden Bestandteilen aus Kaninchen-Leber, -Nieren und -Knochenmark zu einer gewissen Menge inaktiven oder aktiven Kaninchenserums, die an sich noch nicht Choleravibrionen abtötet, läßt sich keine bakterizide Wirkung des Gemisches bzw. keine komplettierende Wirkung der lipoiden Substanzen erzielen.

III. Aus Leber und Nieren von Kaninchen bekommt man keine nachweisbaren hämolytischen Lipide, hingegen in manchen Fällen aus Pankreas und Mesenterialdrüsen.

IV. Verdauungsfermente vermögen die hämolytischen Substanzen von Organen nicht zu vernichten.

V. Bei der Hämolyse durch die Organlipide ist die Seife in unserem Falle nicht nennenswert beteiligt.

VI. Die Eiweißsubstanz der normalen Tiersera hemmt die hämolytische Wirkung der Organextrakte. Diese hemmende Wirkung wird durch Salzsäure-Pepsinverdauung aufgehoben.

VII. Das mit Aether extrahierte Normalserum hemmt in gleichem Grade wie das nicht extrahierte das Organhämolysin.

VIII. Das Bindungsvermögen und die Empfänglichkeit verschiedener Blutsorten für die Organhämolysine sind verschieden.

IX. Die lipoiden Substanzen von Kaninchen-Leber, -Niere und -Gehirn zeigen zwar eine hemmende Wirkung gegen die Hämolyse durch Tetanolysin und Saponin, nicht aber gegen Staphylolysin.

**Literaturverzeichnis.**

- 1) Buchner, Münch. med. Wochenschr., 1894.
- 2) Hahn, Arch. f. Hyg., Bd. 25.
- 3) Schadenfroh, Arch. f. Hyg., Bd. 37.
- 4) Bail, Berlin. klin. Wochenschr., 1897.
- 5) Hankin, British med. Journ., 1890. Proc. of the Royal Society, Vol. 48.
- 6) Christmas, Ann. de l'Institut. Pasteur, T. 5.
- 7) Bitter, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12, 1892.
- 8) Schattenfroh, Münch. med. Wochenschr., 1898, No. 45.
- 9) Conradi, Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 1, 1901.
- 10) Landsteiner u. Ehrlich, Wien. klin. Wochenschr., 1907, No. 33.
- 11) Bail u. Pettersson, Centralbl. f. Bakt., Bd. 34 u. 35.
- 12) Landsteiner u. Ehrlich, Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, 1907.
- 13) Landsteiner u. Jagić, Wien. klin. Wochenschr., 1904.  
Landsteiner u. v. Eisler, Wien. klin. Wochenschr., 1905.  
Landsteiner u. Dautwitz, Hofmeisters Beiträge, Bd. 9.
- 14) Kyes u. Sachs, Berlin. klin. Wochenschr., 1903.
- 15) Noguchi, Proceed. of the Soc. for exp. Biolog. and Medic., Vol. 4, 1907.
- 16) Metschnikoff, L'immunité, 1902.
- 17) Tarrassewitsch, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902.
- 18) Schibayama, Centralbl. f. Bakt., 1901, No. 21.
- 19) Klein, Wien. klin. Wochenschr., 1901, No. 52.
- 20) Korschun u. Morgenroth, Berlin. klin. Wochenschr., 1902, No. 37.
- 21) Woelfel, Journ. of infect. Diseas., 2, 1905.
- 22) Ransom, Deutsche med. Wochenschr., 1901.
- 23) Noguchi, Centralbl. f. Bakt., 1902.
- 24) Müller, Centralbl. f. Bakt., 1903.
- 25) Sachs, Centralbl. f. Bakt., 1904.
- 26) Detre u. Sellei, Wien. klin. Wochenschr., 1904, 1905.
- 27) Landsteiner u. v. Eisler, Wien. klin. Wochenschr., 1904. Centralbl. f. Bakt., 1905.
- 28) Pascuchi, Hofmeisters Beiträge, 1905.
- 29) v. Eisler, Wien. klin. Wochenschr., 1905.
- 30) Kraus u. Clairmont, Wien. klin. Wochenschr., 1901.
- 31) Madsen u. Noguchi, Centralbl. f. Bakt., Referate, 1905.
- 32) v. Eisler, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie, Bd. 3.
- 33) Levaditi, Compt. rend. de la Soc. Biol., T. 58, p. 579.

## **Protein Sensitization and its Relation to some of the infectious Diseases.**

By Prof. **Victor C. Vaughan** (University of Michigan).

With 5 Charts.

### **Part. I. A Toxophor Group in the Protein Molecule.**

In 1904 Wheeler and I (Jour. American Med. Ass. 1905) found that the cellular proteins of typhoid and colon bacilli may be split into poisonous and non-poisonous groups. These bacteria are grown in the large incubating tanks first used and described by me in 1901 (Trans. Ass. Am. Physicians, 1901). With six of these large tanks in operation one hundred and twenty square feet of bacterial, cellular growth is obtained. This cellular substance is washed with physiologic salt solution, then placed in large Soxhlets and thoroughly extracted with alcohol and ether. These extractions leave the cellular protein intact and this is finely ground in an agate mortar and passed through a fine meshed seive. In this way we have obtained the cellular proteins of the following bacteria: *b. prodigiosus*, *b. violaceus*, *b. coli communis*, *b. typhosus*, *b. pyocyaneus*, *b. megatherium*, *b. proteus vulgaris*, *b. ruber* of Kiel, *b. anthracis*, *b. tuberculosis*, *b. diphtheriae*, *m. pneumoniae*, *s. lutea* and *s. aurantiaca*. The cellular substance of these micro-organisms, after all the material soluble in physiologic salt solution, alcohol and ether has been removed, consists of nucleo-proteins which yield, on cleavage with mineral acids, nuclein bases, carbohydrates, mono- and diamino acids. While the chemistry of no one of these bacterial proteins has been exhaustively studied much work along this line has been done by my assistants and students. Wheeler (Trans. Ass. American Physicians, 1902) has demonstrated in the cell substance of *sarcina lutea* the presence of carbohydrate, Xanthin bodies and Hexon bases, and Leach (ibid.; also Journ. Biolog. Chem., 1906 and 1907) has done the same thing with the cellular protein of *b. coli communis* and has also studied the mono-amino acids in this protein. Agnew (in an unpublished research) has studied the mono-amino acids in the cellular

proteins of colon and tubercle bacilli. These investigations have shown not only that the cellular substance of these bacteria consists of proteins, but that each bacillus contains its own peculiar and characteristic protein. For instance, Agnew has found that the percentages of some of the amino acids in the colon and tubercle proteins differ widely as is indicated by the following figures:

	Colon Protein	Tubercle Protein
Glutamic Acid	3,00 %	0,22 %
Glycocoll	0,33 "	0,00 "
Alanin	1,00 "	1,57 "
Valin	1,60 "	5,17 "
Leucin	2,00 "	2,04 "
Phenylalanin	0,20 "	0,56 "

I conclude from the studies of the bacterial cell substances that have been made in my laboratory that these consist, essentially at least, of proteins and that each bacillus consists of a protein *sui generis*.

As has been stated, Wheeler and I found that these bacterial proteins can be split by chemical agents into poisonous and non-poisonous groups and later we extended this research to vegetable and animal proteins and we find after experimenting with nearly thirty different bodies that all the true proteins with which we have worked can be split up in the retort into poisonous and non-poisonous groups. Our method of procedure is as follows: The dried, powdered protein, after thorough extraction with alcohol and ether, is heated in a retort, fitted with a reflux condenser, with from fifteen to twenty-five times its weight of a two per cent solution of sodium hydroxid in absolute alcohol. This extraction is repeated three successive times of an hour each at the temperature of boiling absolute alcohol, 78°. After this has been done it will be found that a distinct and complete cleavage of the protein molecule has been accomplished and that all the poisonous group is in solution in the alcohol, while the non-poisonous portion remains insoluble. As stated, all the true proteins with which we have worked may be split up in this way.

Gelatin yields no poison when subjected to the above given treatment. We found that Witte's pepton does yield a

poison and this has been confirmed by Nicolle and Abt (Ann. de l'Institut Pasteur, Feb. 1908). The French scientists found that Defresne's pepton yields no poison and this we have confirmed. It seems from this that the poisonous group in the protein molecule is destroyed in the formation of pepton. It may be stated parenthetically that it is generally known that the commercial product sold as Witte's pepton is not a pepton at all, but consists largely, if not wholly, of albumose. That the production of a poisonous group from proteins by the method described above is due to a cleavage of the protein molecule along a definite line and is not the result of a degradation change, is indicated by the following facts: 1) When a protein has been thus broken up, the poisonous portion contains no trace of carbohydrate as is shown by the complete failure to respond to the Molisch test. In the cleavage, the carbohydrate is left in the non-poisonous group. 2) The poisonous portion contains no phosphorus; all of this element remains in the non-poisonous part. It seems from this that the nuclein group of the protein molecule constitutes a part, and probably the greater part of the non-poisonous portion of the protein molecule. However, there are, quite naturally, some amino acids in this portion, and Agnew has found in this part of the tubercle protein 1,76 % of leucin, 1,10 % of alanin, 0,63 % of valin, and 0,46 % of phenylalanin. The poisonous group consists largely of mono- and diamino acids.

After the protein has been split up with the dilute solution of sodium hydroxid in absolute alcohol, the portions are separated by filtration. The filtrate is neutralized with hydrochloric acid, avoiding an excess, when sodium chlorid is precipitated and removed by filtration. The second filtrate is evaporated in vacuo and it may be more fully freed from sodium chlorid by re-solution in absolute alcohol. The poisonous group, or the toxophor as it may be called, is soluble in water, but more freely soluble in absolute alcohol, also soluble in methylic alcohol, but insoluble in ether and chloroform. From its alcoholic solution it is precipitated with ether, but prolonged contact with ether renders it less poisonous. Its aqueous solution gives the Millon and biuret tests perfectly, but fails wholly to respond to the Molisch test. The

purest preparation that we have obtained kills full grown guinea-pigs in doses of eight mg. when given intra-abdominally and in a fraction of a mg. when injected intravenously. Subcutaneously the fatal dose is about twice that required when administered intra-abdominally. When administered by the mouth this poison seems inert. It may be destroyed in digestion or it may be absorbed so slowly that it is without visible effect. Its aqueous solution does slowly diffuse through collodion sacs and such sacs filled with solutions of the poison have been placed in the abdominal cavities of rabbits and guinea-pigs without recognizable effect upon the animal.

The effect of the toxophor group of the protein molecule on animals is the same whatever the protein from which it is derived. When a fatal dose has been injected intra-abdominally or subcutaneously, the symptoms develop in three stages which are generally quite distinct and characteristic: First, there is the stage of peripheral irritation in which the animal is more or less excited and scratches itself more or less violently. This continues for a few minutes and is followed by a stage of torpor. The animal lies on its abdomen or side with rapid breathing and with a marked disinclination to move. When forced to move it will generally be observed that there is some difficulty in coördinating its movements and often there is marked paralysis, most noticeable in the posterior extremities. The third stage is one of clonic convulsions generally beginning with opisthotonos and finally involving the whole body. The third stage is in the great majority of cases a sure indication of a fatal termination. After killing several hundreds of animals with this poison I have seen not more than six recover after the convulsive stage has been reached. The dose necessary to develop the first and second stages is very small and may be not more than one fifteenth or even one twentieth of the fatal dose. The stages mentioned above follow each other in quick succession and when a fatal dose has been administered death results in the great majority of cases in less than an hour, most frequently in less than half that time and often within five or ten minutes. The different stages are best brought out when the dose is the minimum fatal amount or but little more



and when the poison is administered subcutaneously or intra-abdominally. When the amount is much greater than that necessary to cause death or when the administration is intravenous the symptoms develop in such rapid succession that the distinction between the stages is lost or the first and second stages may be wholly wanting. It is quite important to state that when the dose is not fatal, the animal speedily recovers and within two hours has apparently wholly recovered. The toxophor group of the protein molecule quite evidently kills by its effect upon the cells of the respiratory center, and from the fact that recovery from apparently a serious and even a hopeless state results so speedily and so completely, I infer that the action of the poison on the cells of the respiratory center consists in arresting their function or temporarily putting them out of commission and not in their physical destruction. Were the respiratory cells broken down by the action of the poison it seems to me that recovery would not be so complete in so short a time. This is a point of great importance in the study of the action of this poison in the infectious diseases.

Aqueous solutions of this protein poison are distinctly acid and slowly decompose sodium bicarbonate and when saturated with this alkali and allowed to stand for some hours or days, the dose necessary to induce a fatal result and the time are both greatly increased. This is of great importance because the most probable explanation of the observed facts is that the poison being an acid combines with the alkali forming a salt and that this must be decomposed in the animal body and the poison set free before it acts upon the cells. In the protein molecule the poisonous group is in combination with the non-poisonous part and this combination must be broken up and the poison set free before it affects the body cells. I will return to this point when I come to speak of sensitization to proteins.

V. C. Vaughan jr. (Jour. Am. Med. Ass., 1905) has made a comparative study of the action of the living colon bacillus, its dead cellular protein and its toxophor group on guinea-pigs and from his paper I make the following abstract:

1) The Action of the living Bacillus: When a guinea-pig is inoculated with a fatal dose of the living colon germ,

practically no symptoms whatever are noticeable for a period varying from six to twelve hours, according to the size of the dose given. This may be considered as the period of incubation and is roughly proportional to the amount of living germ injected. This period of incubation undoubtedly represents the time taken for the bacillus to multiply and to be destroyed to such an extent that sufficient poison may be liberated through its cleavage to produce noticeable toxic effects in the animal. This period of incubation is, therefore, in reality the crisis of the disease and the outcome depends solely on whether all germs have been destroyed before a lethal dose of the poison has been set free or not. It is during this period that individual resistance and acquired

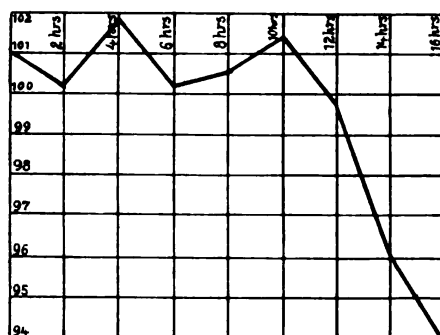


Chart I. Temperature curve of guinea-pig after inoculation with 1 c. c., 16 hr. bouillon culture of the colon bacillus. Death occurred 20 hours after inoculation.

immunity are important factors acting by causing increased bacteriolysis and the destruction of all germs before a fatal dose of poison has been set free. During this time the temperature of the animal may rise to a greater or less extent or may remain stationary; the animal remains active, eats; its coat is not roughened and it appears in all respects as well as a normal animal.

At the end of this period, however, the appearance changes. The animal becomes less active, it remains in one corner of its cage; its coat becomes roughened; it hangs its head and apparently enters into a state of stupor. At the same time the rectal temperature begins to fall abruptly, as can be seen from a study of chart I.

This fall of temperature is often the first marked symptom and, when occurring to a marked degree, it is invariably a bad omen. The temperature will often fall from 101 F. to 94 F. or even lower within from 2 to 4 hours, and this fall is progressive and continuous until the animal's death, immediately preceding which a temperature as low as 87 F. or

86 F. is not uncommon. At the same time the animal shows signs of marked peritoneal inflammation, as is evidenced by rigidity and spasm of the abdominal muscles on pressure. At autopsy, the only gross lesion present is a marked hemorrhagic peritonitis with a large amount of bloody fluid containing intact red corpuscles and leucocytes, in the peritoneal cavity. The parietal and visceral peritoneum are studded with minute punctiform hemorrhages. Hemorrhage is an especially prominent feature in the great omentum and is present to a less marked degree in the mesentery.

2) The Action of the Cellular Protein of the Colon Bacillus (Chart II): On the injection of a fatal dose of the cellular substance intraperitoneally, we notice that the most marked change is in the length of the period of incubation. Thus, whereas

in the case of the living germ from six to twelve hours pass before noticeable symptoms appear, in that of the dead germ substance the animal almost invariably shows symptoms of illness at the end of four hours. In regard to the character of these symptoms it may be stated that they are similar in all respects



Chart II. Temperature curve of guinea-pig after intraperitoneal injection of non-fatal dose of crude bacterial cell substance.

to those induced by the living germ. The temperature remains the same or may rise slightly during the first two hours. At the end of the four hours it has begun to fall and there is a decided drop from then on until the time of death, provided the dose given is a fatal one. If a non-fatal dose has been injected intraperitoneally the temperature, as will be seen from reference to the accompanying chart, has reached a minimum at the end of from six to eight hours and has returned to normal again in from twelve to twenty hours.

As a rule it may be stated that the fall in temperature in non-fatal cases seems to be directly proportional to the amount of bacterial substance injected. That this should be the case seems to be only natural when we consider the fact

that in this instance we have largely done away with that factor which is known as the individual resistance of the animal. As has been previously mentioned in the case of the living bacillus, the individual resistance plays an important part in determining the amount of poison which will ultimately be set free in the body. For example, whereas 1 c. c. of a 12-hour culture of our colon bacillus invariably proves fatal, 0,25 c. c. never does. The explanation of this is to be found in the fact that all animals are able to cause cleavage of all bacilli injected with the smaller dose before a fatal quantity of poison is set free. If now 0,5 c. c. be given, some recover, while others die. In this case we speak of the former as possessing a greater individual resistance than the latter. This simply means that, in the first instance the animal has possessed a sufficient quantity of bactericidal substance directly available to cause cleavage of all bacilli before the latter have multiplied to a sufficient extent to furnish enough poison 'to kill the animal on its liberation. On the other hand, those animals which succumb do not possess quite enough of the bactericidal substance, or at least do not possess it in a form available for immediate use. When, however, the dead bacterial substance is given the dose of poison which the animal receives is a certain definite amount and is not capable of subsequent increase.

Accompanying the fall in temperature there is apparent lassitude, stupor and roughening of the coat. In cases in which many times the fatal dose has been given, the animals occasionally die within from four to six hours with convulsions, a feature which can now and then be observed after the injection of large quantities of the living bacillus. At autopsy we find a picture similar in all respects to that following inoculation with the living colon bacillus. There is a marked hemorrhagic peritonitis, the peritoneal cavity containing bloody fluid, together with unabsorbed bacterial cell substance, and the omentum and mesentery showing numerous punctiform hemorrhages. It is needless to state that in all cases cultures were made from the peritoneal cavity and heart's blood immediately after death, and these proved to be sterile. From this we see that practically the sole difference between the effects

following inoculation with the living bacillus and the injection of the dead bacterial substance is a shortening of the period of incubation due, no doubt, to the fact that the intracellular poison is liberated much more rapidly and in greater concentration in the second case. As will be seen later, it is not so much the absolute quantity of the poison which is injected that determines the result, as the amount which is active at a given time.

3) The Action of the Toxophor Group of the Colon Bacillus: When doses of this poison are given intraperitoneally in amounts varying from 8 to 60 milligrams, according as to whether we have been careful to remove most of the common salt or not, a fatal result follows in guinea-pigs in from 30 to 60 minutes. Within 15 minutes after injection the temperature begins to fall and sometimes within half an hour has reached 94 F. or even lower. At first, after an interval of from 5 to 10 minutes immediately following the injection, the animal appears restless, runs about the cage and shows a great tendency to scratch itself, this undoubtedly being due to itching sensations in the skin caused by irritation of the peripheral nerves. The animal then begins to show evidence of lack of co-ordination, which is rapidly followed by partial paralysis, which is especially marked in the hind extremities. This stage lasts for from 5 to 10 minutes, during the latter part of which the animal usually lies quietly on one side. From this state the animal passes into what one might term the convulsive stage. These convulsions are usually clonic in nature and, as a rule, at first involve only the neck muscles, the head being momentarily drawn backward. At first these convulsions are but slight in degree and are separated by considerable intervals of time. Soon, however, they become much more frequent and of much greater severity. Gradually they become more and more general in their extent until all the muscles of the body become involved in violent clonic convulsions. This stage when present invariably presages a fatal outcome. During a convulsion, or occasionally in the interval of calm, respiration ceases. The heart, however, continues to beat, at first with perfect regularity and no acceleration; indeed, the rate seems to be somewhat slower than normal. Gradually the beat becomes more and more feeble,

the rate and regularity being preserved to the end. It is usually only after an interval of from three to four minutes after the cessation of respiration that the heart ceases to beat. As has been previously stated, a fatal issue, if it occurs at all, always results within one hour after injection and usually within from thirty to forty minutes. Death results at slightly different times with different batches of the poison, but even in this case the interval of time between injection and a fatal issue does not vary to any great extent. A dose which has proved to be the minimum fatal dose for one pig will almost surely prove to be the same for another. In other words, we have done away with the period of incubation, and the poison acts so rapidly that individual resistance plays no part; hence, the animal acts almost with the exactitude of a chemical compound into which for all practical purposes it has been converted. The period of incubation has ceased to exist since the poison is no longer contained within either the dead or the living bacillus, but is present in a free and uncombined form, capable of uniting immediately with those body cells for which it may possess a special affinity.

At autopsy no special gross lesions can be made out. The peritoneum is smooth and shiny throughout and there is not the slightest evidence of either hemorrhage or even marked congestion in the omentum or mesentery. This is a very important feature and in marked contrast to the hemorrhagic peritonitis found after injection of either the living or the dead colon bacillus. We are inclined to believe that it is the distinguishing feature between the injection of the poison in a comparatively free and in a combined state. At one time we attempted to obtain the poison by a simpler method, omitting the extraction of the crude substance with ether. The result was that on evaporation of the alcoholic filtrate we obtained a sticky residue which it was utterly impossible to pulverize or to weigh. We were compelled, therefore, to content ourselves with evaporating it to a sticky mass, which was then immediately dissolved in water. The solution of the poison thus prepared was very toxic but, as a rule, took from one to two hours or even longer to bring about a fatal result. The animals showed the roughening of the coat and the stupor

characteristic of the living and dead bacillus, but not as a rule seen in the case of the powdered poison. Furthermore, the majority of these animals showed during life unmistakable signs of peritoneal inflammation. They died in convulsions. At autopsy an intense hemorrhagic peritonitis was present, which was particularly prominent in the omentum and mesentery, and hemorrhage was often present in the capsules of the liver and the spleen. From the fact that death was slower in these cases and that the symptoms were more like those seen after inoculation with the living bacillus, we are inclined to believe that in this instance the poison, although split off from the bacillus itself, still exists in combination with some other cell group and that it is essential that this combination be broken up before the poison can be set free and can act on the body cell.

When a non-fatal dose has been injected the symptoms first noticed are similar in all respects to those following a fatal dose. The animal becomes restless, shows signs of irritation of the peripheral nerves, incoordination and partial paralysis. The con-

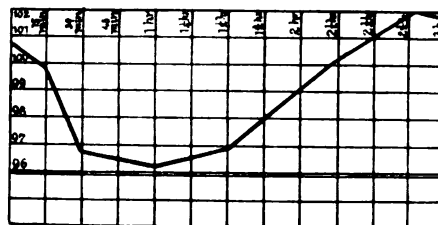


Chart III. Temperature curve of guinea-pig treated with 45 mgs. of the soluble poison intraperitoneally.

vulsive stage is not present, as a rule, and when it is noticed, is evidenced solely by slight movements separated by considerable intervals of time. We have never seen a case showing marked generalized convulsions which recovered. Recovery is apparently rapid and complete and within two hours after injection the animal which has been desperately ill appears as well as any untreated animal. The maximum effect is obtained within from forty-five to sixty minutes in every instance. The study of the changes in temperature in these animals is particularly interesting. Within fifteen minutes the rectal temperature has begun to fall and has reached a minimum within one hour. It remains stationary for a short time and then begins to rise again and at the end of three hours after the injection has usually returned to normal or above (Chart III).

## **Part II. Attempts to induce Immunity with the Toxophor Groups of the Colon and Typhoid Bacilli.**

We have attempted to secure both passive and active immunity with the toxophor groups of the colon and typhoid bacilli. Goats and rabbits have been treated for varying periods of time with gradually increased doses of these poisons and the sera of these animals have been tested against the respective poisons and living cultures of the bacilli and I am thoroughly convinced that no anti-body is induced in the animals thus treated, or at least no anti-body is present in the serum of animals thus treated. The toxophor group of the protein molecule gives no evidence of developing an anti-toxin in animals treated with it and all our attempts to secure passive immunity or to obtain either an antitoxic or a bactericidal serum by treating animals with the toxophoric groups of the proteins of the colon and typhoid bacilli have terminated in negative results.

That some degree of tolerance for the poison may be established in animals by carefully increasing the dose, my students and I have demonstrated. This increased tolerance, however, developed in rabbits and guinea-pigs, is not great and at best amounts to not more than two or three times the fatal dose in an untreated animal. It is an interesting fact that animals brought into this state of increased tolerance to the poison also bear from one to two times the minimum fatal dose of the living bacillus. Animals that have had a single non-fatal dose of the poisonous portion are able to withstand twice the lethal dose of the living culture given the next day, but this increased resistance induced by a single dose is transitory and has usually disappeared or at least is markedly diminished by the second or third day. However, the increased resistance induced by many successive doses is more lasting, manifesting itself for thirty days. The temperature curve of an animal previously treated with the soluble poison when inoculated with twice the fatal dose of the living culture is practically identical with that of an untreated animal when inoculated with less than a fatal amount of the living culture. This is shown in chart IV.



In both these animals the minimum temperature is reached within from six to eight hours, after which it gradually ascends to the normal. This similarity suggests that we have here a condition analogous to that generally spoken of as natural immunity, and this suggestion is supported by the fact that this increased resistance to living cultures of the colon bacillus may be secured by previous treatments of the animal with the poisonous groups split off from egg albumin and pepton as well as with that from the colon bacillus itself. It is quite certain that the increased resistance to the living culture secured by treatment with the soluble poison is not specific. This point is an interesting one, especially in view of the well-known fact, attested by several independent investigators,

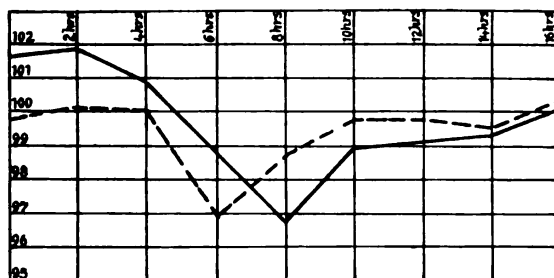


Chart IV. ——— Curve of normal animal inoculated with non-fatal dose of living germ. — — — Curve of immune animal inoculated with living colon bacillus.

that increased resistance to certain pathogenic bacteria may be secured by previous intraabdominal injections of various protein solutions.

It is important to note that the toxophor obtained from egg-white or serum-albumin or globulin or in fact from any of the proteins with which we have worked does not in either single or repeated doses sensitize the animal to the unbroken protein from which it has been derived. Indeed, so far as its effects upon animals are concerned the toxophor group is the same whether the protein from which it has been derived be bacterial, vegetable or animal.

### Part III. The Haptophor Group in the Protein Molecule.

We have generally designated this as the "residue", meaning by this term what is left of the protein molecule after

the extraction of its poisonous group and we have spoken of the "colon residue", "typhoid residue", "egg-white residue", etc. While the poison obtained by our method seems to be, physiologically at least, probably not chemically, the same whatever the protein from which it is derived this is not true of the "residue" or haptophor group which seems to be specific or at least to contain a specific group in each protein. It should be clearly understood that I do not claim that everything soluble in the absolute alcohol after a protein has been submitted to our method of cleavage is poison, nor that everything left insoluble in the alcohol is haptophor, I only intend to say that the one protein contains the poison and the other the specific body. After the protein has been split up with the alcoholic solution of sodium hydroxid, the "residue" is placed in large Soxhlets and for several days extracted with absolute alcohol in order to remove the free alkali which it contains. After this the residue is dried and powdered, and weighed portions of it are shaken with physiologic salt solution containing one half per cent of phenol and passed through a porcelain filter. Such a filtrate has been kept in ordinary glass stoppered bottles for more than four years without any detectable change or deterioration.

Single doses of the haptophor, whatever the protein from which it has been derived, are without visible effect upon the lower animals or man. I have repeatedly injected 500 mg of the colon or the typhoid residue into the abdominal cavities of guinea-pigs, twice this amount into rabbits and 500 mg of the residue from the tubercle bacillus subcutaneously in man without recognizable effect. This, however, does not mean, as we shall see, that any of these residues, even in small doses, are really without effect upon the cells of the animal body. Indeed, we shall see that they do most profoundly affect the body, so profoundly that the effect may continue throughout the life of the animal and in some instances may be transmitted to the young. A guinea-pig sensitized with the residue of egg-white remains sensitized to unbroken egg-white for two years, as we have shown, and possibly throughout life, and if it be a female the young are sensitized to the same protein.

Guinea-pigs and rabbits treated with repeated doses of the non-poisonous part of the colon bacillus bear from six to eight times the minimum fatal amount of the living culture. The degree of immunity induced by these treatments depends not so much upon the total amount of the residue given as upon the number of injections and the length of time through which they are continued. There is, therefore, no object in using large doses of the residue in inducing immunity, because smaller doses given through a longer period induce a higher degree of immunity.

The clinical pictures obtained by immunizing animals to the poisonous and the non-poisonous portions of the colon bacillus differ in an interesting way. As has been stated,

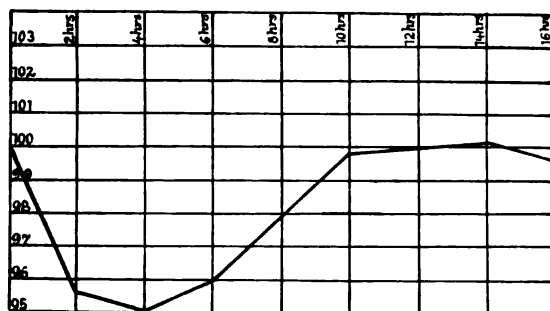


Chart V. The temperature curve of an animal immunized with the colon residue and afterwards inoculated with twice the lethal dose of the living culture.

the symptoms induced in a pig by inoculation with twice the minimum fatal dose of the living culture after injections with the poisonous part are identical with those observed after inoculation of an untreated animal with less than a lethal dose of the culture. But animals immunized with the non-poisonous part and subsequently inoculated with twice the minimum fatal dose of the living culture are very ill within an hour, much sooner than the control, and after from six to eight hours, just when the control begins to manifest symptoms, the immunized animal begins to improve. All this is indicated in the temperature, as shown in the accompanying chart V.

V. C. Vaughan jr. (Journ. of Med. Research, 1905)  
and Wheeler and I (New York Med. Journ., June 22, 1907)

have discussed quite fully the subject of experimental immunity induced by the treatment of animals with the residues or haptophor groups obtained from colon and typhoid bacilli. It needs to be said here, however, that this form of immunity is specific. The haptophor immunizes only against the homologous bacillus.

The residue of egg-white sensitizes to unbroken egg-white as has been shown by Wheeler and myself (*Journ. of Infectious Diseases*, June 1907) and it has been shown by Nicolle and Abt (*Ann. de l'Institut. Pasteur*, Feb. 1908) that the residue obtained from the proteins of blood serum sensitizes to bloodserum. This means that when a guinea-pig is treated subcutaneously, intravenously or intraabdominally with the haptophor of egg-white and after a period of ten days or longer is treated with unbroken egg-white, the animal is seriously poisoned, manifesting grave symptoms within a few minutes and in the majority of instances dying within less than an hour. It is of the greatest importance to note that the animal that has been sensitized to any protein develops, on the second administration of the same protein after the proper time interval, exactly the same symptoms that characterize the effects of the free protein poison or the toxophor as we have described them. These symptoms are identical, consisting of the three stages already described. These symptoms develop in the same time, follow the same sequence and terminate in the same way. In regard to this point Wheeler and I (*Jour. of Infectious Diseases*, June 1907) have made the following statement:

"We can see no escape from the conclusion that the active agent in our toxophor obtained by chemical means from egg-white, and the substance that kills the animal sensitized to egg-white, when a second dose of this protein is administered, is one and the same. Both are constituents of the egg-white, and are groups in the same complex molecule. However, if one wishes to contend that egg-white is not made up of complex molecules, as we hold, but is a physical mixture of substances among which our haptophor and toxophor exist, he still cannot avoid the conclusion stated in the preceding sentence any more than he can escape the conviction

that the man who dies from morphin and the one who dies from opium die from the same poison. The symptoms induced by the toxophor split off by chemical agents and those observed in the animal sensitized to egg-white on the second administration of this substance are identical in every particular. They originate in the same time, proceed in like order, and terminate alike. The mode of death is the same and the post-mortem findings in both are identical. We must, therefore, conclude that the process of sensitizing an animal consists in developing in its body a substance which affects the egg-white, just as the alcoholic solution of alkali does in the retort, but much more promptly and efficiently."

"It is equally certain that our artificially obtained haptophor contains the substance which develops in the body of the animal the capability of speedily and effectively splitting up the egg-white, or, if one prefers, extracting and liberating its poisonous constituent. This is shown by the fact that our haptophor sensitizes animals to the poisonous action of egg-white quite as well as egg-white itself does. The poison in egg-white therefore has nothing to do with the sensitization of the animal, and that there is no poison left in our artificially prepared haptophor is shown by the demonstration that it does not sensitize to itself. It seems that the demonstration of these points is complete and incontrovertible."

"We must conclude that the introduction of egg-white or its haptophor constituent into the blood of an animal, by either intra-abdominal or subcutaneous injection leads to the production of a new digestive or proteolytic secretion. It leads to the development of a new function on the part of certain body cells, and this new function consists in the elaboration of a secretion which breaks up egg-white in the animal body, very much as we have broken it up with the alcoholic solution of alkali but much more quickly and efficiently. This new proteolytic secretion is formed and held in certain cells in the body until these are stimulated by the reappearance of egg-white in the circulatory blood. This secretion belongs to that class of bodies which have long been designated as ferments or enzymes and its action is specific. It splits up egg-white and no other protein. It is called into existence

by the introduction of egg-white or its haptophor into the circulation of the animal. The introduction of this foreign protein into the body calls for some means for its disposal. The body has no agent by which this can be accomplished, and, as a consequence, certain cells are called upon to produce such an agent. These cells respond to this call and begin to elaborate the needed enzyme. Gradually and somewhat slowly these cells acquire this new function. By means of this new enzyme the foreign protein is split up and some of the split products probably serve certain cells in the body as food material, while others constitute a menace to health and even to life. Our haptophor group contains the sensitizing body, that which calls into existence this new function and leads to the elaboration of the new proteolytic enzyme. Our toxophor group contains the substance that endangers the life of the animal. As our experiments have shown, danger to the life of the animal depends not so much upon the amount of the free toxophor introduced into the animal as upon the amount set free at one time. When we first introduce egg-white or other foreign protein it is slowly broken up and no recognizable harm is done the animal. The same is true when frequent injections are made at short intervals of time. But when this new function of splitting up a foreign protein is called into existence and time enough is given for the cells concerned in the development of this new enzyme to store this up within themselves, where it probably exists not as an active enzyme, but as a zymogen, then a second portion of this same foreign protein is introduced, the specific zymogen becomes an active enzyme, and the foreign protein is split up so rapidly that enough of the toxophor body is set free within a given time to affect seriously the animal and possibly destroy its life."

"We wish to call attention to the fact that in the development of either sensitization or immunity each protein apparently has its own individuality and characteristics. The haptophor of the protein of the colon or typhoid bacillus, provided the dose be a small one, will sensitize a guinea-pig within 30 minutes, so that it will successfully dispose of from four to six times the minimum lethal dose of a living culture of

the bacterium; but this sensitization begins to diminish in from three to seven days, and is wholly lost in between 30 and 40 days; while the haptophor of egg-white requires from 10 to 12 days to develop a recognizable degree of sensitization. But the condition having been established, it continues, without apparent diminution for months, possibly for years, and may be transmitted to the offspring of the sensitized animal. We infer from this that the haptophor of the bacterial protein causes only a slight and temporary modification in the animal cells that supply its specific proteolytic enzymes, while the haptophor of the egg-white produces a profound and lasting effect upon the same animal cells. This is also shown by the fact that the bacterial protein kills at the first dose, while the egg-white must be given a second time. Each protein will need to be investigated individually before we can confidently make any statement concerning the amount of it necessary to sensitize, the time that must elapse before the condition of sensitization is established, and the continuance of the condition, and we wish to state that while our method of splitting up proteins in the retort has, in the case of all proteins with which we have worked, yielded a toxophor body, it has with several proteins failed to give a sensitizing or immunizing haptophor. The pneumococcus when broken up with alcoholic alkali gives a poison, but the non-poisonous portion gives no immunity to the living organism, and so far we have not been able to obtain a sensitizing or immunizing haptophor from casein. This is not at all strange, because casein, as is well known, is quite a different protein structurally from egg-white. It is probable that with other reagents, or with the same reagents in different proportions, we may get from the cellular substance of the pneumococcus and from casein immunizing and sensitizing proteins, but we wish to state clearly that each protein will need to be investigated before anything can be predicted concerning the haptophor, and it is possible that there may be proteins that contain no true haptophor groups. We make no claim of the discovery of a universal law."

If it be objected that I have no justification in comparing the effect of so gross an agent as an alcoholic solution of

18\*

sodium hydroxid with so delicate a one as an enzyme, I need only inquire in return whether or not there is any difference between the tyrosin obtained by the disgestion of protein with the pancreatic juice and that prepared from the same protein by splitting it up with 30 per cent. sulphuric acid? Moreover, the trypsin acts at the temperature of the animal body while the protein is boiled with the acid and yet both processes yield the same tyrosin. Compared with 30 per cent. sulphuric acid our dilute solution of sodium hydroxid in absolute alcohol is mild indeed. It is characteristic of enzymes that they induce at relatively low temperatures chemical reactions that can otherwise be brought about only with powerful chemicals at relatively high temperature. Chemists have, quite properly, compared the complicated structure of the protein molecule to that of a house of cards. When the house of cards is blown down whether it be by the breath of the child that built it or by a blast of wind it is blown into cards in each case, nothing more. The greater force may scatter the cards more widely and may even twist and tear some of the individual cards, but on the whole the house is broken up into its constituent parts whatever the force of the blow.

#### **Part IV. Protein Sensitization and Immunity induced with the Protein Haptophor.**

We have found that previous treatment of animals with the haptophor of the protein of the colon or of the typhoid bacillus gives specific immunity to the living organism, and that previous treatment with this portion of the egg-white protein renders the animal susceptible to the next dose of the same protein, so that it kills. In one instance the life of the animal is saved; in the other it is jeopardized, and in the majority of instances lost. These phenomena seem to be antipodal and yet if we interpret them aright they are identical. The colon or the typhoid bacillus is only a specific, living protein. It is a protein in an active, metabolic state, capable of absorbing, assimilating, and multiplying. The egg-white is the product of life and with the potentiality of again becoming a living protein. The bacillus is made up of labile molecules.



while the molecules of the egg-white have passed into a more stable condition. The one is in an active, the other in a resting state; the one is actively engaged in trading in energy, the other is temporarily at least quiescent, and yet both are proteins, markedly similar in their chemical composition and yet characterized by a specific difference. Both are essentially proteins, made up of an acid or poisonous chemical nucleus and a basic or non-poisonous group. The former in its effect upon animals is the same, whether derived from the bacillus or the egg-white, and the latter in the one instance induces specific immunity and in the other specific susceptibility. But the immunity and the susceptibility each consists in developing in the animal body the capability of splitting up a specific protein. If the living protein be split up before it has had time to multiply sufficiently to furnish a fatal quantity of the toxophor the animal lives and we say that it has been immunized. If the stable protein be introduced into the animal body it develops a specific proteolytic ferment, and if enough of it to supply a fatal dose be injected after this function has been developed, the animal dies.

Susceptibility to egg-white and immunity to the living colon bacillus induced by its haptophor group are in my opinion different manifestations of one and the same process. Both depend upon the development in the animal body of a specific proteolytic ferment. When this specific ferment splits up a living foreign protein before it has time to multiply we say that the animal is immune. When this cleavage action is less prompt, but sufficiently so to split up the living protein before it elaborates a fatal amount of the poison, the animal sickens, but recovers. When the action of the ferment is still less prompt and the living protein constructs enough poison to kill, then its liberation causes death. When this specific proteolytic ferment has been developed in the animal by previous treatment with a dead or stable protein, it is easy to inject a second dose of the same protein in sufficient quantity to quickly induce symptoms and to kill, then we say that the animal has been sensitized or is in a condition of hypersensibility. With a dead, stable protein it is easy so to adjust the dose that the animal will show no symptoms, or

manifest the first and second stages and recover, or die. With a live or labile protein the conditions are much more complicated and consequently the result is more uncertain and less controllable.

It seems to me that the time has come for us to recognize that the mechanism of immunity is not the same in all infections and intoxications. In my opinion there is already sufficient ground to justify us in holding that there are at least three forms of immunity:

1) **Antitoxin immunity.** — The poisons to which this form of immunity has been secured are the venoms of serpents, certain vegetable poisons, such as ricin and abrin and the toxins of bacillus diphtheriae, b. tetanus, and b. botulinus, and possibly others may be added to this list in the future. These poisons apparently constitute a distinct group and they resemble enzymes in the following striking particulars: a) in aqueous solution they are destroyed by a temperature of 100° or less; b) they are active in solutions so dilute that they do not respond to the three most characteristic protein color reactions, the biuret, Millon and Molisch tests; c) animals treated with successive doses at proper intervals develop anti-bodies; d) their effects are not immediately manifest but develop after a period of time. Ehrlich's side-chain theory must be regarded as the most satisfactory explanation of this form of immunity. There is no proof at present that either phagocytic activity or protein cleavage has any concern in the production of this form of immunity. 2) **Phagocytic immunity.** — This form of immunity has been best studied with the cocci and it has been shown experimentally that with avirulent or slightly virulent strains phagocytic activity may be markedly increased, but that with highly virulent cultures it is difficult to demonstrate marked destruction of bacteria by the phagocytes. 3) **Sensitization or lytic immunity.** — This is sometimes designated as bactericidal or bacteriolytic immunity but there are the following objections to either of these: a) Bacterial proteins are not the only proteins that may be split up in the animal body. Most foreign proteins when introduced into the circulation without subjection to the digestive juices undergo specific proteolysis and this is true

whether these proteins be living or dead. b) The cleavage of poisons in the animal body is probably not confined to those of protein composition. c) The term bactericidal is inappropriate because the bacteria may be so altered chemically that they are robbed in part or wholly of their harmful properties and yet they are not killed. Examples of the persistence of specific bacteria in the body after recovery from the disease are well known and immunity may coexist with the specific bacterium of the disease still living in the body. The bacterial protein owes its poisonous action to its molecular structure and this may be so modified as to render the organism a comparatively harmless guest without destroying its life. d) The term bacteriolytic is inappropriate, because all these poisons are not bacterial and the term implies that the bacterial cell is destroyed and this does not always happen. For the reasons thus briefly and imperfectly stated, I prefer the word "lytic" to designate the form of immunity secured in protein sensitization.

#### Part V. Sensitization in Typhoid Fever.

There is no antitoxin for the typhoid poison; phagocytic action certainly is not a marked factor in the natural recovery from this disease, and it is my purpose to see what light the study of protein sensitization throws upon the nature, progress and recession of this infection.

It is probable that in some diseases two of the above mentioned immunizing or protective factors may combine in aiding the body in its contest with infection. Future studies may show a closer relation between phagocytic and lytic protection than can be demonstrated at present, but both differ so radically from antitoxin immunity that to try to explain them by the same theory seems to be without justification. Such passive immunity as we secure when we treat a diphtheritic child with specific antitoxic serum is wholly without parallel in typhoid fever, colon infection, tuberculosis or pneumonia. In the former the cellular activities of the child are not awakened; its circulatory system may be compared to a large branched test-tube into one arm of which the toxin produced by the bacillus growing in the pharynx is forced

while into another arm the anti-body or neutralizing agent is introduced. The treatment of diphtheria with its antitoxin is in essence an experiment in vitro with only this difference that if the poison is not neutralized by the antidote promptly it may act upon certain cells in the child's body and may cause death, and just to the extent that it is not neutralized it does endanger life. In the other diseases mentioned there are no such soluble poisons and we possess no such antidotes, but the poisons are particulate, living, multiplying cells and they can be destroyed only through the activity of the body cells and when the invading cells are destroyed their poisonous constituents can be neutralized only through the activity of the body cells.

From a recent paper of mine (American Journ. of Med. Sciences, Sept. 1908) I make the following extracts: "When one becomes infected with the typhoid bacillus there is a period of incubation which according to our best information lasts some ten days or longer. In the guinea-pig inoculated with a fatal dose of the typhoid bacillus the period of incubation continues for ten or more hours. During these periods in both the man and the animal the bacillus multiplies and yet there is no evidence that either the man or the guinea-pig is for the time being aware of the abnormal condition or conscious of the presence of the undesirable guest. The sickness begins when the animal body becomes sensitized and begins to split up the bacilli. It is probable that this sensitization does not occur until some of the bacilli undergoing autolysis or being broken up by phagocytic action furnish the soluble residue which can reach a large portion of the body cells. We know that an individual may carry the typhoid bacillus in his gall bladder or urinary bladder or in an abscess for years without having typhoid fever. The bacillus grows and multiplies in one of these cavities and in greater or less numbers breaks up. The poisonous portion being diffusible is taken into the circulation and causes more or less marked departure from health, but the residue being non-diffusible there is no general sensitization of the body."

Protein sensitization may be local or general. There are certain reasons for believing that the sensitizer must reach a

body cell before it can sensitize it. This is the reason why the residue fails to sensitize so long as it is confined to a cavity, such as the gall bladder, and it also explains why the soluble residue produces general sensitization while the unbroken bacillus acts only locally and imperfectly. Moreover, this explains the development of acute poisoning with such soluble proteins as egg-white, blood-serum, milk etc. It is impossible to induce such explosive reaction with non-soluble proteins such as living or dead bacilli. When the first or sensitizing dose of a soluble protein is administered, every cell in the blood and lining the blood vessels is reached, and again when the second or poisonous dose is administered the same cells are reached practically at the same moment and according to our theory the zymogen in all these cells is activated at the same time and the effect is explosive — an effect that can be produced only by soluble bodies. Again, when the poison is set free slowly much of it is probably fixed by the immediately surrounding tissue and the disastrous effect on the life of the animal that comes from an overwhelming action on the respiratory center is avoided.

The fact that the administration of a large dose of the residue simultaneously with or very near in point of time with the inoculation with the bacillus increases the susceptibility of the animal, while a much smaller dose of the residue increases the resistance and repeated doses give immunity is an interesting fact. I have interpreted this finding as follows: The residue converts the zymogen into an active enzyme and at the same time absorbs it. The attraction is between the residue and the enzyme. The latter combines with the former more readily when it is free than it does when the residue is still a part of the bacterial cell. When large quantities of the residue are given, the activated ferment is all or largely taken up by the free residue and there is no splitting up of the bacterial proteins; consequently the bacillus multiplies without hindrance; but when the zymogen is activated by only a small amount of residue, the greater part of the enzyme is used in splitting up the bacilli. This is, I think, an important point and in using the residue in the treatment of typhoid fever must always be borne in

mind, because it must determine the dose of residue to be administered.

If the residue acts upon man as it does upon guinea-pigs, it should prove an efficient, but a temporary, vaccine against typhoid fever. In guinea-pigs a single injection of the residue gives the animal protection against twice the fatal dose of the living bacillus for about 40 days and it is presumable that it would protect against natural infection in which the number of bacilli introduced is much smaller for a longer time. That Wright's vaccination against typhoid fever was of some service in the Boer Campaign seems quite well substantiated, but he employed the unbroken bacillus, while in animals at least the residue is much more efficient, because as I have attempted to explain the soluble residue gives a more general and consequently a more efficient sensitization than the unbroken bacillus, since the latter has to be split up before it can give any general sensitization at all. Besides, the residue causes no local irritation or inflammation about the point of injection and the sensitization produced by it is systemic from the start. However, the possible use of the residue as a vaccine is not the special purpose of this paper and the subject will not be further pursued at present.

If my interpretation of our experimental work be correct whether one treats typhoid fever with the residue obtained by splitting up the bacillus chemically or with the blood serum of an animal that has been treated repeatedly with the unbroken typhoid bacillus, in either case he uses the residue. In one case the residue has been obtained by chemical cleavage of the typhoid proteid in vitro and in the other the residue has been obtained by enzyme cleavage in the animal. An animal may be sensitized to egg-white by the residue obtained chemically as shown by Wheeler and I or with the blood serum of a sensitized animal as shown by Gay and Southard; or an animal may be immunized with the residue of the typhoid bacillus obtained chemically or by the filtered peritoneal exudate of an animal killed with the living typhoid bacillus. It is the residue in either instance that sensitizes or immunizes. If this be true there is every advantage in

favor of the employment of the residue obtained chemically. Firstly, it is much less expensive to obtain the residue by chemical cleavage than by administration of the bacillus to animals. Secondly, the residue makes a much better preparation, it is less bulky and does not contain all the foreign matter that is contained in blood serum. Thirdly, in employing blood serum one risks sensitizing his patient to the proteids of blood serum while the residue does not sensitize to itself. Fourthly, the dosage may be determined accurately with the residue obtained chemically.

If typhoid fever could be recognized in its early stages when sensitization and cleavage of the bacillus is only local and imperfect, then I should hope for great advantage in its treatment with the residue. This soluble sensitizing agent acting promptly as it does might be expected to split up the bacillus before it becomes so numerous and the abortion of the disease might be easily brought about. Reed, Shakespeare and I (Report on the Origin and Spread of Typhoid Fever in U. S. Military Camps during the Spanish War of 1898) ascertained that many of the light febrile attacks among the soldiers in our camps in 1898 were typhoidal; they gave at least temporary immunity to the disease and they responded to the Widal test. These abortive attacks are best explained on the ground of early systemic sensitization and destruction of the bacillus. Furthermore we found that in its early stages typhoid fever is often apparently intermittent and this is best explained as due to local and incomplete sensitization. If the disease could generally be recognized in this stage the residue should be of great service in aborting the disease. In this stage small doses of the residue, not more than 50 mg. should prove of marked service. It is to be hoped that some means for the early and positive diagnosis of this disease will soon be discovered.

The problem is quite a different one when it comes to the treatment of well developed typhoid fever when there is an abundant bacteremia. In this stage one of the dangers to life is the too rapid and abrupt cleavage of the bacilli with the liberation of the poisonous group in such quantity that it may overwhelm the nervous system. Even here, however,

the residue may be of service in the saving of life if wisely used, but it may prove a two-edged sword and cut both ways if not used with intelligence. Larger doses of the residue by absorbing or combining with the specific proteolytic ferment may retard the cleavage of the bacillus, diminish the quantity of poison set free in a certain time and save the life of the patient, but with the effect of prolonging the disease as Richardson (Boston Med. and Surg. Journ., 1907) has shown.

Richardson has shown the apparent value of the residue in preventing relapses in typhoid fever. The employment of the residue for this purpose seems to me rational and in accord with the general statements that I have made. In this disease there are frequently especially resistant bacteria that escape the general lytic cleavage that destroys most of their fellows. These withdraw into the tissues, multiply and then venture again into the circulation. Richardson's work apparently shows that a judicious stimulation of the function of sensitization serves a valuable purpose in preventing these relapses.

In conclusion I wish to say that so far as I can see today it is not probable that we will ever get an antitoxin for the treatment of typhoid fever comparable with that which we have for diphtheria, but that the residue may be of service especially in preventing relapses and if we can find some method of early diagnosis it may prove of value in aborting the disease.

#### **Part VI. Sensitization in Tuberculosis.**

The haptophor of the tubercle protein as it has been prepared in my laboratory is tuberculin or the tubercle protein with its poisonous group removed; at least this is my conception of it. It seems to me that recent studies on protein susceptibility and immunity, incorrectly designated as anaphylaxis, furnish some suggestive information concerning the genesis of tuberculosis. The tubercle bacillus is a living protein which for countless generations has infected man. Practically



it has become an obligate parasite. Although it may retain its vitality when ejected from the animal body, under natural conditions it does not multiply until it finds lodgement in another host. Like all obligate parasites it grows slowly in the host, because its continued existence is dependent upon the life of the host. It protects itself against the cells of the body and their proteolytic enzymes by coating itself as it were in fats and waxes. The bacilli that die in the tubercular nidus in the host undergo autolytic cleavage slowly and the extent to which the body cells are sensitized is at first quite limited. Sensitization to or against the tubercle protein is accomplished in the same way as the body cells are sensitized to or against any other foreign protein such as egg-white, blood-serum, edestin or zein. Before a body cell can be sensitized to the tubercle protein or any other protein that protein or its haptophor group must be brought into contact with the body cell in soluble form. The result of bringing the haptophor group of the tubercle protein into contact with body cells is the development in the body cells of a specific proteolytic ferment which splits up the tubercle protein, whether it be living or dead, whether it be an organized cell in the form of a tubercle bacillus or a solution of the tubercle protein in the form of tuberculin. It seems to me that the *modus operandi* of a solution of the tubercle protein on tissue cells is nicely illustrated by the ophthalmo reaction as applied to the eye of a non-tubercular individual. When tuberculin, which is essentially a solution of tubercle protein, is applied to the eye of such a person for the first time there is no visible effect just as there is no visible or otherwise recognizable effect from the first injection of egg-white, blood-serum or any other soluble foreign protein subcutaneoulsy, intra-abdominally or intravenoulsy into a guinea-pig or a child. But when a second instillation of tuberculin is made into the same eye of the non-tubercular person after the proper time interval there is in at least a large per cent. of cases a more or less prompt or violent reaction just as happens when the second injection of a like foreign protein solution is made into the guinea-pig or the child. The first instillation

into the eye of the healthy individual has developed in the tissue cells with which it has come in contact a specific proteolytic ferment which digests or splits up the tubercle protein. The same thing is seen after the injection of tuberculin or its haptophor group into an individual who has a localized tubercular focus, such as a tubercular joint or lupus. The tissue cells about the tubercular focus have already been sensitized by the autolytic products originating in the disintegrating bacilli and the injection causes a local reaction which consists in the liberation of the proteolytic ferment stored in these cells with the digestion or splitting up of the tubercle protein, whether it be dead or alive, organized or unorganized, within its range. When tuberculin is injected this specific enzyme stored in the sensitized cells is in part at least consumed in breaking up the tubercle protein injected and there is only a part of it left to split up and destroy the tubercle bacilli that constitute the infection. When the haptophor only is injected the entire destructive force of the enzyme falls upon the infection. When tuberculin is injected, as the profession has learned by experience, the most benefit is derived when the smallest dose possible, necessary to sensitize, is employed.

In advanced general or pulmonary tuberculosis the ophthalmic reaction fails because the blood and possibly other fluids of the body already carry enough soluble tubercle protein to keep all the sensitized cells exhausted of their ferment just as repeated injections of egg-white or other foreign proteins at short intervals into a guinea-pig are not followed by any reaction. To expect any good effect in these cases to follow treatment with either tuberculin or its haptophor is without justification. It is as senseless as would be the application of the whip or spur to the horse dying or dead of exhaustion. For reasons that must be evident from the foregoing it has seemed to me that the ophthalmic reaction is of marked prognostic, as well as of diagnostic, value.

Recent studies in protein sensitization and the demonstration of the presence of a poisonous group in the protein

molecule with the study of the effect of this group on animals have done much, as I interpret these studies, to clear up the problem of the genesis of tuberculosis and for the first time I am able to explain, in a way satisfactory to myself at least, the effect of tuberculin in both the healthy and the tubercular animal. In the treatment of tuberculosis I prefer to employ the non-poisonous, sensitizing or haptophor group of the tubercle protein molecule for reasons already made plain, but I think that the *modus operandi* is in essence the same whether the unbroken molecule or its sensitizing part be used, just as one may sensitize a guinea-pig to egg-white with either the unbroken protein or its non-poisonous portion. However, while some light has been thrown upon the genesis and nature of tuberculosis, the problem is still far from complete solution. The size of the sensitizing dose in the treatment of the disease, in order to get the best results, is still undecided. Certainly, when tuberculin is used the dose must be the smallest possible necessary to sensitize. It is also certain that when the tissue cells have reached the stage of exhaustion or the body has been placed in the negative phase, the employment of any derivative of the tubercle bacillus in the treatment of the disease is without warrant at present at least. Furthermore, it has been frequently demonstrated both in animal experimentation and in the treatment of the disease in man that this negative phase in which the body is absolutely without resistance to the bacillus can be induced by over-treatment with tuberculin. The same helpless condition can be established by the employment of large doses of the haptophor especially when administered at short intervals. The time interval between doses is possibly of even greater importance than the size of the dose. Time is required for exhausted cells to recover their function. The guinea-pig that has received one injection of egg-white is in a negative phase for about ten days and if after that time the animal is given a non-fatal dose of the same protein, a longer, but as yet undetermined, period must elapse before the animal passes into the positive or active phase again. These intervals necessary for the development of an active phase ap-

parently differ with the protein employed and the animal subjected to the treatment and with the tubercle protein they have not been determined in either the experimental animal or in man.

### **Zusammenfassung.**

1) Eiweiß läßt sich durch alkoholische Alkalilösungen in eine „toxophore“ und „haptophore“ Gruppe zerlegen.

2) Die toxophore Gruppe tötet die Versuchstiere bei subkutaner, intraperitonealer und intravenöser (nicht per os) Darreichung unter charakteristischen Symptomen (Lähmung des Atemzentrums).

3) Die Vergiftung bei Infektion mit Typhus, Coli etc. beruht auf dem Freiwerden dieser toxophoren Gruppe.

4) Die toxophore Gruppe ist weder antigen noch erzeugt sie Ueberempfindlichkeit gegen das Protein, von dem sie stammt.

5) Das „Residuum“ des Eiweißkomplexes nach Abspaltung der „toxophoren Gruppe“, die haptophore Gruppe, ist ungiftig und imstande, Ueberempfindlichkeit zu erzeugen.

6) Durch die Vorbehandlung mit der haptophoren Gruppe (resp. mit dem ganzen Eiweißkomplex) wird ein Enzym erzeugt, das bei der Reinokulation des betreffenden Eiweißes aus diesem dasselbe toxische Prinzip in Freiheit setzt, das aus dem Protein durch alkoholische Alkalilösung sich künstlich abspalten läßt.

7) Ueberempfindlichkeit und Immunität gegenüber Typhus-Coli-Bakterien etc. sind verschiedene Erscheinungsformen desselben Prozesses.

8) Die therapeutische Anwendung der künstlich isolierten haptophoren Gruppe des Typhus- und Tuberkuloseerregers ist zu empfehlen.

(F.)

## **Die Tuberkuloseinfektion und die Immunisierung gegen die Tuberkulose durch die Verdauungswege.**

Von Prof. A. Calmette<sup>1)</sup>,  
Direktor des Pasteur-Institutes zu Lille.

Meine Herren! Gestatten Sie mir, Ihnen zuvörderst meinen überaus lebhaften Dank auszudrücken für die große Ehre, die Sie mir dadurch erweisen, daß Sie mich einladen, vor Ihrer illustren Gesellschaft den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse über die Rolle des Verdauungstraktus bei der tuberkulösen Infektion und bei der Immunisierung gegen die Tuberkulose darzulegen.

Seit mehreren Jahren ist diese Frage der wesentlichste Gegenstand von Laboratoriumsuntersuchungen, die ich mit Unterstützung einiger meiner Schüler, insbesondere mit C. Guérin, fortführe. Sie beschäftigt gleichfalls vorzugsweise eine große Anzahl Forscher in allen Ländern. Es ist kaum eine Frage fesselnder, als diese, wie das die Erörterungen auf unseren jüngsten Kongressen dartun.

Ich behaupte keineswegs, Ihnen hinreichend einleuchtendes Beweismaterial dafür zu bringen, daß wir etwa berechtigt seien, zu behaupten, wir könnten für eine sehr nahe Zukunft die Schaffung einer Methode ermöglichen, welche die Menschheit sicher gegen die furchtbarste der sie verheerenden Plagen zu schützen vermögen. Doch will ich mich bemühen, Sie die wichtigsten experimentellen Tatsachen kennen zu lehren, auf die wir uns heute stützen können, um den Mechanismus der tuberkulösen Ansteckung besser zu begreifen, und die Hoffnungen als wenigstens zum Teil verwirklicht zu betrachten, welche man häufig vergeblich in uns erweckt hat.

Vor 43 Jahren lehrte uns Villemin, daß die Tuberkulose überimpfbar und ansteckend ist, und 16 Jahre trennen uns von der denkwürdigen Zeit, in welcher Robert Koch seinen Bacillus entdeckte und züchtete und so dessen Spezifität erwies. Trotz der enormen Häufung von Arbeiten, die in dem letzten Viertel des vorigen Jahrhunderts veröffentlicht wor-

1) Nach einem Vortrag.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. 1.

den sind, sind wir nur sehr unvollkommen über die relative Bedeutung der verschiedenen Wege, auf welchen das tuberkulöse Virus in den Organismus des Menschen und empfindlicher Tiere eindringt, unterrichtet. Bis in diese letzten Zeiten betrachtete die größte Anzahl der Gelehrten, Kliniker wie Experimentatoren, den respiratorischen Ursprung der Lungentuberkulose als ein unerschütterliches Dogma, und die denkwürdigen Debatten, die auf den internationalen Konferenzen zu Haag 1906, zu Wien 1907 und seither in verschiedenen gelehrten Gesellschaften statthatten, sind Ihnen zu sehr gegenwärtig, als daß es nötig wäre, an sie zu erinnern. Sie lassen erkennen, daß sich eine endgültige Uebereinstimmung in naher Zeit herstellen wird und daß, wie stets, die Wahrheit nicht in den extremsten Anschauungen enthalten ist.

Wenn es unleugbar erscheint, daß in gewissen, vermutlich sehr seltenen Fällen die direkte Lungeninfektion — durch eingeatmete Luft — zustande kommt trotz der zahlreichen und sehr wirksamen Verteidigungsstellen auf dieser Bahn, so ist doch offenbar, daß der normalerweise vom tuberkulösen Virus nach dem Lungenparenchym hin eingeschlagene Weg am häufigsten die Lymph- und Blutzirkulation ist, vermöge der großen Eintrittspforte des Digestionsrohres.

Das Experiment zeigt, daß man, um die Bedingungen der primären aërogenen Lungeninfektion zu verwirklichen, zu extraphysiologischen Versuchsbedingungen seine Zuflucht nehmen muß, wie es Nocard, Flügge und ganz jüngst Kuss getan haben, indem sie die Tiere immobilisierten, um sie zu langwährender Einatmung einer mit infektiösem, feuchten oder trockenen Staub beladenen Luft zu zwingen. Der flüssige, sehr feine Staub ist sicherlich gefährlich, besonders für die kleinen Kinder, und es erscheint einleuchtend, daß die käsigen Pneumonien und die Spitzentuberkulosen des ersten Lebensalters fast stets respiratorischen Ursprunges sind. Falls eine mit Lungentuberkulose behaftete Mutter oder Amme hustet oder niest, und zwar in kurzer Entfernung von den Lippen des mit offenem Munde atmenden oder in Erwartung der Mutterbrust schreienden Säuglings, so ist die Ansteckung durch Einatmung fast unvermeidlich; aber für das

ältere Kind und für den Erwachsenen bildet dieser Infektionsmodus sicherlich die Ausnahme.

Eine noch größere Ausnahme bildet die Infektion durch trockenen Staub, und die positiv ausgefallenen Experimente Cornets sowie diejenigen von Kuss, die so ausgeführt wurden, daß man die unbeweglichen Tiere in einem Raum einsperrte, der in der Mitte einer Wolke von Talkstaub oder Pflanzenfaserresten, die mit ausgetrocknetem Sputum vermischt wurden, enthielt, entkräften in keiner Weise die negativen, viel zahlreicheren Resultate, die von Baumgarten, Tappeiner, Cadéac und Mallet, Petersson und von mir in Gemeinschaft mit Vansteenberghe veröffentlicht worden sind.

Beweist überdies die normale Keimfreiheit der Luftwege nicht in hohem Maße die Schutzwirkung ihrer Verteidigungsmittel, sofern jene nicht von präexistierenden Verletzungen des Nasen-Pharynxraums, des Larynx und der großen Bronchien betroffen sind?

Die primäre tracheo-bronchiale Drüsenerkrankung, die gewisse Autoren als stets abhängig von einer respiratorischen Infektion betrachten, kann überdies nicht als ein Argument angesehen werden, welches zugunsten dieser spricht. Wenn es richtig ist, daß diese Affektion, entsprechend dem Parrotschen Gesetz, stets von einem oder mehreren Lungentuberkeln begleitet ist, oder ihr solche vorausgegangen sind, so beweist nichts, daß diese letzteren aërogenen Ursprunges sind, denn sie zeigen sich mit größter Häufigkeit bei Tieren, die artefiziell durch den Digestionsapparat infiziert worden sind. Ich habe sie meinerseits mit M. Breton regelmäßig bei einer großen Anzahl von Meerschweinchen beobachtet, die ich durchs Rectum infizierte, oder denen ich mittels der Oesophagussonde eine kleine Quantität einer feinen Emulsion einer reinen Rindertuberkulose-Bacillenkultur einführte. Sehr häufig zeigten diese Tiere, die nach 4—5 Wochen getötet wurden, keine anderen Läsionen als ein bis zwei oberflächliche Tuberkel von Stecknadelkopfgröße, die in einem der vorderen Lungenlappen saßen und die von einer enormen Anschwellung des peribronchialen Drüsenpakets begleitet waren. Ein Beobachter, der die Bedingungen, unter denen die Infektion künstlich herbeigeführt wurde, nicht kennen würde, würde

zweifelloos versichern, daß es sich hier um eine Ansteckung respiratorischen Charakters handle.

Es ist also unleugbar, daß, wenn auch die primäre Tuberkuloseinfektion der Lunge oder der tracheo-bronchialen Drüsen durch direkte Einatmung bacillenbeladenen Staubes möglich ist, sie doch zu den Ausnahmen gehört.

Viel häufiger — aber auch weniger schwer ist die natürliche Ansteckung durch die Verdauungswege.

Wenn ich behaupte, daß die Tuberkulose sich sehr häufig durch den Darm verbreitet, so will das keineswegs sagen, daß ich den Nahrungsmitteln und folglich der Milch tuberkulöser Kühe die wesentliche Rolle bei der Ansteckung des Menschen zuschreibe. Ich bin im Gegenteil überzeugt, daß man in den letzten Jahren viel zu sehr die Wichtigkeit der Uebertragung durch die Milch übertrieben hat. Die Tatsache, daß die Tuberkulose so allgemein ist, beim Kind und beim Erwachsenen, in den Ländern, wo der Gebrauch der Milch von Kühen nur selten bei der menschlichen Ernährung in Frage kommt, z. B. in Aegypten, Indien, Indochina, Japan, zeigt, daß die Verbreitung der Tuberkulose von Mensch zu Mensch unendlich viel allgemeiner ist als die vom Rind zum Menschen.

Ohne Zweifel stellt die Einführung von Milch tuberkulöser Kühe eine wirkliche Gefahr vorzüglich für junge Kinder und sogar für gesunde Erwachsene dar, wenn diese Einverleibung virulenten Materials sich häufig wiederholt — besonders für diejenigen, deren Darmmucosa keine völlige Integrität aufweist. Aber die Gefahr ist unendlich viel größer und häufiger gegenüber den Bacillen menschlichen Ursprunges, die frisch von den Lungen eines Kranken kommen, wenn z. B. diese Bacillen mit Speichel auf unsere Nahrungsmittel oder auf unsere Mundschleimhaut durch direkte oder indirekte Berührung des Mundes, der Hände, beschmutzte Gegenstände etc. gelangen oder durch Fliegen verbreitet werden. Die tuberkulöse Mutter, die die Suppe kostet, die für ihr Kind bestimmt ist, oder die ihm das Gesicht mit ihrem Taschentuch abwischt, die Amme, die ihre Brust mit ihrem Speichel befeuchtet, das Kind, welches seine Speisen mit den Händen berührt, mit



denen es vorher auf dem Fußboden gespielt hat, der Erwachsene, der seine Finger befeuchtet, um ein Buch zu durchblättern oder sich Gebrauchsgegenstände bedient, die tuberkulösen Bacillenspeiern gehören, sie verschlingen in jedem Augenblick einige virulente Mikroben, und die Gefahren der Ansteckung sind für sie um so schwerer, je reichlicher und je häufiger diese Einverleibungen werden.

Wie wäre es auch zu bezweifeln, daß die Rolle der Fliegen eine besonders wichtige und unheilvolle in den ungesunden Wohnungen sein muß, wo sie unter den Kranken, den Kindern und Erwachsenen, die Seite an Seite in enger Gemeinschaft leben, in dichten Massen wimmeln und abwechselnd auf dem Speichel und den Speisen sich anhäufen!

Das aufmerksame Studium der tuberkulösen Infektion bei den Tieren liefert uns in Fülle klinische Beweise für das Vorherrschen der Ansteckung auf den Verdauungswegen.

Man weiß z. B., daß Fleischfresser, wie Löwe, Tiger, Hyäne oder Schakal, sehr häufig Tuberkulose der pulmonalen oder visceralen Form in unseren Menagerien akquirieren, wenn man sie mit tuberkulösem Fleisch ernährt, während diese Tiere im Zustand der Wildheit niemals spontan tuberkulös sind. Der Hund wird tuberkulös wenn er den Speichel seines kranken Herrn schluckt, das Kalb, die Katze und das Schwein erwerben die Tuberkulose, wenn man sie mit bacillenreicher Milch ernährt.

Man hat in der letzten Zeit mit Recht das vollkommene Fehlen der Tuberkulose bei den amerikanischen Schweinen betont, die ausschließlich mit Mais oder anderen vegetabilischen, dem Kochprozeß unterworfenen Substanzen ernährt werden, während diese Krankheit äußerst allgemein bei den Schweinen unserer europäischen Bauernhöfe ist, überall, wo man sie die nicht pasteurisierten Molkereirückstände verzehren läßt.

Es ist einleuchtend, daß die Tuberkulose, die sich so entwickelt — am häufigsten mit primären Affektionen des Brustfells oder der Bronchialdrüsen — von der im Verdauungstraktus erfolgten Bacillenresorption herrührt. Diese reichlichen Bacillen können die Darmwand durchdringen, in die Lymph-

und Blutzirkulation eintreten und dort kürzere oder längere Zeit im Organismus zirkulieren, bevor sie hier die charakteristischen Veränderungen der tuberkulösen Infektion hervorbringen.

Experimentell wurde diese Tatsache zuerst von Chauveau 1866—1872 demonstriert, dann von Villemin, Aufrecht, Gerlach, Klebs, Günther und Harms und vielen anderen Beobachtern, unter denen man vornehmlich Saint Cyr, Viseur, Bollinger, Orth, Toussaint, Baumgarten, Rabinowitch, Parrot, Ravenel, Schroeder, Cotton u. a. nennen muß. Doch scheinen gewisse bedeutsame negative Versuche, speziell die von Colin (d'Alfort) und von Moeller veröffentlichten, zu beweisen, daß die Tiere ungestraft große Mengen tuberkulöser Substanzen verschlingen können. Wir kennen heute den Grund dieser Erscheinung. Die künstliche Infektion durch den Digestionstraktus kommt unfehlbar nur dann zustande, wenn man gewisse, von mir im Verein mit C. Guérin präzisierte Vorsichtsmaßregeln anwendet: es ist nötig, daß man die Bacillen in einem solchen Zustand der Verteilung zur Absorption bringen läßt, daß sie fein emulsiert bleiben, wie sie es im Sputum oder in der Milch sind. Unter diesen Bedingungen genügt gewöhnlich eine einzige Fütterung, die tuberkulösen Veränderungen hervorzubringen, die bei jüngeren Tieren am häufigsten längere oder kürzere Zeit auf die Mesenterialdrüsen lokalisiert bleiben, bei Erwachsenen hingegen zu Anfang in den Lungen erscheinen.

Beim Studium des Mechanismus der Absorption von Staub seitens der Darmschleimhaut konnte ich mit Vansteenberghe durch exakte Beobachtung dieselben Tatsachen feststellen. Die Einführung von feinem schwarzen Aschestaub oder besser von chinesischer Tinte, vermengt mit den Nahrungsmitteln, bringt bei den älteren Meerschweinchen die typischen Veränderungen der Lungenanthrakose hervor, während beim jungen Meerschweinchen die gefärbten Körnchen länger oder kürzer in den Mesenterialdrüsen bleiben. Die Schnitte durch verschiedene Teile des Dünndarmes, die während der Verdauung fixiert wurden, lassen alsdann diese farbigen Körner wiedererkennen, die, in Leukocyten eingeschlossen, in den Chylusbahnen der Zotten liegen.

Bei Wiederholung unserer Experimente haben Sir William Whitla und Symers<sup>1)</sup> jüngst dieselben Feststellungen gemacht, und diese Gelehrten bedienen sich einer genialen Versuchsanordnung, die ihnen erlaubte, gleichzeitig Tuberkulose und Anthrakose der Lungen oder Mesenterialdrüsen herzustellen: dieser Vorgang besteht darin, daß man junge oder ältere Meerschweinchen ein Emulsionsgemisch von Tuberkelbacillen und Chinatinte in Olivenöl absorbieren läßt.

Der Versuch an großen Tieren, z. B. Rindern, gestattet noch mit größerer Sicherheit, die Bahn zu bestimmen, welche die Tuberkelbacillen einschlagen, um bis zu den Lungen zu gelangen, wenn man, wie ich es in Gemeinschaft mit C. Guérinat, die Tiere tötet und dabei den Zeitraum, der seit der einzigen infizierenden Verfütterung verflossen ist, zunehmend größer wählt. Man kann sich dann überzeugen, daß diese Bacillen, wie es Chauveau, dann Dobrokowski gezeigt haben, die Intestinalschleimhaut durchsetzen, auch wenn diese völlig intakt ist, und daß sie im allgemeinen dort keine Spur ihres Durchganges zurücklassen. Von den polynukleären Leukocyten werden sie die Chylusgefäße der Zotten entlang bis zu den nächstgelegenen Mesenterialdrüsen geleitet.

Bei den Tieren, die saugen, und beim kleinen Kind werden sie häufig in diesen lymphatischen Organen, welche in bezug auf die Lymphe die Rolle eines fast vollkommenen Filters spielen, zurückgehalten. Bald werden sie hier vernichtet, bald schaffen sie hier tuberkulöse Veränderungen, welche zu Verkäsungen führen, wobei die Mikroben in die ausführenden Lymphkanäle ausgeschüttet werden, oder zuweilen auf das Bauchfell.

Bei den älteren Individuen, deren Mesenterialdrüsen — wie Weigert gezeigt hat — weit durchgängiger sind, werden die Bacillen stets in den polynukleären Leukocyten eingeschlossen, mit der Lymphe des Ductus thoracicus bis zum rechten Herzventrikel geführt und in die Lungenkapillaren getrieben. Wenn die befallenen Leukocyten bereits ihre

---

1) The etiology of pulmonary tuberculosis. Cavendish Lecture, 1908. The Lancet and British Med. Journal, July 11<sup>th</sup>, 1908.

amöboide Bewegung infolge ihrer Vergiftung durch das von den Bacillen secernierte Tuberkulin eingeübt haben, sind sie unfähig, per diapedesin die Kapillarwandungen zu durchsetzen, und sie schaffen dann feine Embolien, die zum Ausgangspunkt so vieler tuberkulöser Umwandlungen auf Kosten der Gefäßendothelien werden (graue Granulationen von Laennec).

Die so geschaffenen tuberkulösen Veränderungen entwickeln sich in der Folge entweder nach der Verkalkung oder nach der Verkäsung hin. Im letzteren Fall entleeren sich die Tuberkel in die Alveolen oder in ein lymphatisches oder venöses Gefäß, viel seltener in eine kleine Arterie. Sie setzen dann eine mehr oder minder rasche, mehr oder minder schwere Aussaat des Giftes in anderen Körperregionen.

Bei meinen Experimenten mit C. Guérin habe ich die größte Häufigkeit tracheo-bronchialer Drüsenerkrankung bei jungen Rindern konstatiert, wenn die Bacillen das Filter der Mesenterialdrüsen überschritten und die Lungen erreicht hatten. Diese Drüsenerkrankung steht in konstantem Verhältnis zu einer oder mehreren tuberkulösen, subpleuralen Veränderungen, die leicht zu entdecken sind.

Der digestive Ursprung dieser Veränderungen ist vollkommen klar. Wir haben sie mehreremal hervorgebracht, und Vallée (d'Alfort) hat sie ebenfalls erhalten, indem er Kälber mit Milch nährte, die von tuberkulösen Kühen herührte, oder die Bacillen direkt in eine Mesenterialdrüse nach Laparotomie einimpfte.

Wir konnten außerdem bei einigen unserer digestiv injizierten Tiere primäre Lokalisation der Tuberkulose an anderen Organen als Mesenterialdrüsen oder Lungen beobachten. Wir sahen sie unter der Form von Pleuritis, Arthritis, Orchitis und in einem sehr bemerkenswerten Fall, bei einer jungen Ziege, von Iritis erscheinen. Diese seltenen Lokalisierungen kamen nur bei Tieren, die ein einziges Mal mit geringen Mengen Bacillen infiziert waren, vor. Man kann annehmen, daß sie wegen ihrer geringen Zahl, lange in der Blutzirkulation von einigen polynukleären Leukocyten befördert, verblieben sind und daß sie eine tuberkulöse Veränderung nur

in den Organen etablierten, wo diese Leukocyten vom Tode betroffen wurden.

Wie man auch diese Tatsachen deuten mag, sicher bleibt, daß die so benannte primäre Lungentuberkulose und daß viele andere Formen und Lokalisationen der tuberkulösen Infektion offenbar in einer großen Zahl der Fälle herrührten von dem Eindringen von tuberkulösem Virus in die Verdauungsbahnen.

Die überzeugten Anhänger der Theorie von der vorherrschenden Rolle der Infektion durch Einatmung, besonders Flüge in Deutschland, Kuss in Frankreich, wenden ein, daß man, um künstlich eine Tuberkulose durch Fütterung hervorzubringen, die Tiere Tausende oder Millionen von Bacillen absorbieren lassen muß, während einige wenige jener, sofern sie inhaliert werden, hinreichen, tuberkulöse Lungenveränderungen hervorzubringen.

Die so denken, vergessen zu sehr, daß unter den Millionen der eingebrachten Bacillen es nur einer geringen Zahl — ohne Zweifel auch nur einigen — gelingt, die Darmmucosa zu durchschreiten, und daß der größte Teil derjenigen, die sie überschreiten, später in den Mesenterialdrüsen zerstört werden. Endlich werden nur sehr wenige von den Leukocyten bis zum Strom des Ductus thoracicus und bis zu den Lungenkapillaren geführt. Aber diejenigen, die dort anlangen, bestimmen alsdann diese intravaskulären tuberkulösen Veränderungen, die von Borrel, später von Letulle so gut beschrieben worden sind und deren langsame, etappenartige Entwicklung mit der Phthise endet.

Wenn so viele Aerzte dabei verharren, zu glauben, daß der Mensch sich bezüglich der tuberkulösen Ansteckung anders verhält als die Tiere, so rührt das vielleicht daher, daß die alten Ideen von Miasmen noch immer unser Denken beeinflussen!

Ohne Zweifel haben einige unter uns die Bedeutung und Häufigkeit der Ansteckung des Menschen durch die Milch übertrieben, und die, welche behaupten, daß die Tuberkulose häufiger durch den Darm als die Luftwege erworben wird, tragen die Strafe für diese Uebertreibungen.

Auch müssen wir gegen die Tendenz, den intestinalen Ursprung mit dem alimentären auf eine Stufe zu setzen, Einspruch erheben. Ganz gewiß ist für unsere Gattung der kranke Mensch — das kann nicht genug betont werden — der hauptsächliche Faktor der Verbreitung der Tuberkulose. Aber ich glaube, daß es nötig ist, es deutlich auszusprechen, daß der Mensch, wenn er auch in Ausnahmefällen — besonders im jugendlichen Alter — Tuberkulose durch Einatmung von Bacillen erwerben kann, sie sich bei weitem öfter durch häufig und lange Zeit wiederholte intestinale Resorption von einigen dieser Bacillen, die frisch von einem Tuberkulösen stammen, zuzieht.

Auf dem Kongreß zu Kassel, am 26. September 1903, gab v. Behring dem Gedanken Ausdruck, die Lungentuberkulose des Erwachsenen könnte wohl nur das späte Manifestwerden einer im jugendlichen Alter erworbenen intestinalen Infektion sein. Um diese Meinung aufrecht zu erhalten, stützte er sich auf die Häufigkeit von Beobachtungen pulmonärer Veränderungen bei älteren Rindern, während die jüngeren am häufigsten solche des Mesenteriums aufweisen.

Die Experimente, die ich mit Guérin angestellt habe, und diejenigen von Vallée haben die Ungenauigkeit einer solchen absoluten Behauptung erwiesen. Wir wissen heute, daß man künstlich Lungentuberkulose bei älteren Rindern, Ziegen, Affen, Meerschweinchen erzeugen kann, indem man sie einer oder mehreren infizierenden Fütterungen aussetzt.

Weil die Ansteckung auf dem Digestionswege so leicht ist, muß man sich wundern, daß die Tuberkulose für das Vieh in den landwirtschaftlichen Betrieben keine verbreitetere und mörderischere Krankheit ist.

Allein die Tierärzte und die Züchter stellen häufig fest, daß gewisse Tiere ungeschädigt bleiben, obschon sie während Jahren mit kranken in Berührung gewesen sind. Häufiger noch geschieht es, daß Rinder auf Tuberkulin prompt bei der ersten Probe reagieren, ein wenig später zu reagieren aufhören und alle Erscheinungen vollkommener Gesundheit bewahren.

Muß man also annehmen, daß bei den ersteren Individuen das tuberkulöse Virus nicht gehaftet hat und daß die zweiten befähigt sind, von einem ersten Anfall vollkommen zu heilen? Auch hier wird der Versuch uns Klarheit gewähren.

Wenn wir jungen Kälbern in einer einzigen infizierenden Fütterung eine kleine Dosis vom Rinde stammender Tuberkelbacillen beibringen, die fein verteilt sind, damit die Absorption erleichtert wird, so stellen wir fest, daß alle diese Tiere ausnahmslos Tuberkulose erwerben. Sie reagieren im Mittel 30 Tage später auf die Tuberkulinprobe, und wenn wir sie in der Folge noch jeden Monat prüfen, so sehen wir, daß einige unter ihnen nach 3, 4 oder 5 Monaten zu reagieren aufhören. Bei der Tötung zeigen diese letzteren keinerlei tuberkulöse Läsion; erhält man sie am Leben und versucht sie aufs neue dadurch zu infizieren, daß man sie kurze Zeit später eine neue Dosis von Virus absorbieren läßt, welches sicher andere gleichaltrige Kälber tuberkulös zu machen imstande ist, so sieht man, daß sie gesund bleiben.

Diese Tiere haben tatsächlich ihre ersten Läsionen ausgeheilt und müssen als geschützt betrachtet werden, wenigstens für eine gewisse noch unpräzisierte Zeitdauer.

Bringen wir im Gegensatz hierzu anderen Kälbern nicht ein einziges Mal, sondern in mehreren aufeinander folgenden infizierenden Fütterungen in kurzen Intervallen eine Serie kleiner Dosen von Bacillen bei, so hören sie nicht nur niemals auf, auf Tuberkulin zu reagieren, sondern die Tuberkulose verschlimmert sich sehr schnell und wird rasch tödlich.

Die Tiere, die einer Serie von sukzessiven Reininfektionen ausgesetzt sind, die aufeinander so rasch folgen, daß sie nicht die Zeit haben, von ihrem ersten Anfall zu genesen, sind in unvermeidlicher und endgültiger Weise tuberkulös!

Wir verstehen nun, warum in einem nur mit mäßiger Intensität infizierten Milieu gewisse Individuen mehr oder weniger lange der Ansteckung widerstehen: sie sind wahrscheinlich vacciniert oder sie sind durch eine erste Attacke, deren Läsionen zu heilen Zeit hatten, bevor eine neue Gelegenheit zur Ansteckung sich bot, widerstandsfähiger gemacht worden.

Es ist nicht leicht, den Beweis zu erbringen, daß dieser Zustand von Immunität, erworben durch einen vorausgegangenen ausgeheilten Anfall, in gleicher Weise beim Menschen besteht. Die ausgedehnte klinische Beobachtung aller Kranken gestattet uns indessen, zu behaupten, daß sie wenigstens in vielen Fällen sehr wahrscheinlich ist. Sie erscheint überdies einleuchtend bei alten Trägern skrofulöser Veränderungen, und nach den Feststellungen von Marfan, die von 1886 datieren, haben zahlreiche Aerzte ähnliches veröffentlicht.

Man muß sich fragen, ob es sich hier um eine wirkliche Immunität handelt, die von längerer oder kürzerer Dauer ist, die nicht nur durch die Abwesenheit der Tuberkulinreaktion — diese ist nicht hinlänglich beweisend — sich manifestiert, sondern auch durch das Nichtfortbestehen virulenter Bacillen in den verschiedenen Drüsengruppen des Organismus.

Nun zeigen die Versuche, die ich mit C. Guérin über diesen Gegenstand angestellt habe, daß vom 4. Monat nach der vaccinierenden Bacilleneinbringung ab keine Drüse mehr für Meerschweinchen virulent ist: also sind die Bacillen resorbiert und vollständig verschwunden.

Wir wollten die Widerstandsfähigkeit so auf dem Digestionswege vaccinierter Tiere in Hinsicht auf eine intravenöse Inokulation prüfen. Diese war hinlänglich, um bei Kontrolltieren sicher die rapide Entwicklung einer miliaren Spitzentuberkulose in 4—6 Monaten hervorzubringen. Diese Probe wurde bei 6 Rindern 8 Monate und 12 Monate nach der vaccinierenden Fütterung vorgenommen. Alle vaccinierten Rinder widerstanden und behielten die Erscheinung vollkommener Gesundheit. Aber plötzlich, 8 Monate später, zeigte eines unter ihnen, obschon es isoliert gehalten wurde unter Bedingungen, unter denen eine Ansteckung von außen nicht stattfinden konnte, die ersten Symptome einer schweren tuberkulösen Mastitis. Alle anderen wurden nun getötet: sie hatten auf Tuberkulin nicht reagiert und zeigten keine sichtbare tuberkulöse Veränderung, aber ihre Bronchial- und Mesenterialdrüsen enthielten noch lebende, virulente, auf Meerschweinchen überimpfbare Bacillen.

Sie hatten demnach, nach 8 Monaten, die Bacillen, die ihnen intravenös injiziert waren, nicht absorbiert, während die



Bacillen, die ihnen vorher auf dem Digestionswege eingeführt worden waren, schon im vierten Monate nicht mehr nachweisbar waren. Und diese Bacillen, die latent im Körper blieben, brachten keine pathologische Störung, keine follikuläre Veränderung bis zu dem Tage hervor, da die Immunität aufhörte, und sie fähig wurden, plötzlich mehr oder minder schwere Alterationen zu setzen.

Andere Versuche haben uns zu konstatieren gestattet, daß Rinder, die bereits Träger gutartiger tuberkulöser Veränderungen sind und auf Tuberkulin reagieren, oder gesunde Rinder, durch 2 oder 3 starke intravenöse Tuberkulininjektionen vorbehandelt, eine vollkommen exzeptionelle Widerstandsfähigkeit gegen schwere tuberkulöse, auf venösem Wege vorgenommene Infektionen besitzen. Während die neuen Kontrolltiere der Spitzentuberkulose in 4—6 Wochen erliegen, akquirieren die bereits tuberkulösen oder in der oben geschilderten Weise vorbereiteten Tieren stets Tuberkulose chronischer Form von sehr langsamer Entwicklung. Sie zeigen also eine unvergleichlich höhere Resistenz als die gesunden Tiere.

Man beobachtet ähnliche Erscheinungen bei künstlich oder spontan auf dem Verdauungswege Tuberkulisierten, wenn man ihnen später eine Tuberkulosekultur unter die Haut impft. Wie Koch es bereits für das tuberkulöse Meerschweinchen bei seinen ersten Arbeiten über das Tuberkulin bekannt gegeben hat, bildet sich ein Abszeß im Niveau des Einstichpunktes, aber die benachbarten Drüsen werden nicht ergriffen und der Abszeß heilt, wenn er sich nach außen entleert hat.

Man konstatiert ähnliche Tatsachen bei der menschlichen Krankheit. Jeder weiß, daß eine lokale vereiterte Tuberkulose, die bei einem Lungentuberkulösen hinzutritt, den Zustand des Kranken bessert und seine Resistenz erheblich steigert. Umgekehrt ist es selten, daß die Personen, bei denen die Lungentuberkulose sich in raschem Tempo entwickelt, vorher Drüsen-, Knochen- oder Hauteiterungen durchgemacht haben, ausgenommen die Fälle, wo eine ungünstige chirurgische Operation eine Blutvergiftung hervorbringen konnte. Es ist eine wohlbekannte Tatsache, daß ungefähr ein Viertel der Lupuskranken charakteristische Auskultations-

phänomene der Lungentuberkulose darbieten und daß jene sich bei ihnen sehr langsam entwickelt; ebenso werden viele Lupöse sehr alt.

Wenn man sich wohl daran erinnern will, daß gewisse Kliniker behauptet haben, bei Phthisikern wirkliche Besserungen im Gefolge kutaner Verimpfungen von Kulturen virulenter Rindertuberkulose (F. Klemperer) oder toter Bacillen (M a r a g l i a n o) oder von Kulturen von Menschentuberkulose, die durch Passage durch den Körper von Kaltblütern (Krokodil) modifiziert wurde (M o e l l e r), zu erhalten, so sind die experimentellen Tatsachen, von denen ich soeben gesprochen habe, dergestalt, daß sie bis zu einem gewissen Grade ihre Behauptungen rechtfertigen.

Aber eine derartige therapeutische Methode ist sicher zu verurteilen. Sie ist es um so eher, als wir im Tuberkulin ein Mittel besitzen, das ebenso wirksam und weniger gefährlich ist und denselben Zweck zu erzielen gestattet.

Alles in allem, die Resistenz, welche das Tuberkulin erzielt, und diejenige, welche man bei Tieren oder Menschen beobachtet, die bereits von gutartigen Formen der Tuberkulose befallen sind (Tuberkulose der Drüsen oder Skrofulose, Tuberkulose der Knochen oder der Haut, Lupus), scheint von derselben Natur zu sein, wie diejenige, die man künstlich herstellt, sei es durch intravenöse Ueberimpfung von Rinder- oder Menschenbacillen nach Methoden von v. Behring oder Koch und Schütz, sei es durch subkutane Impfung derselben Bacillen (Lignières, Arloing) oder durch Einbringung von Kollodiumsäckchen, die Kulturen von Rinder- oder Menschentuberkulose enthalten, unter die Haut (Heymans).

In keinem dieser Fälle handelt es sich um eine wahre Immunität, weil die so behandelten Tiere, obschon sie für die Tuberkulosereaktion unempfindlich sind, auf unbestimmte Zeit Träger lebender, virulenter Bacillen bleiben, die fähig sind, wenn die Resistenz nachzulassen beginnt, im Organismus dieser Tiere schwere Veränderungen zu setzen.

Erinnern wir uns, daß einerseits im Experiment von Melun (1906) die Bacillen der Probeimpfung bei mit Behrings Bovovaccin geimpften Tieren noch nach 6 Monaten nicht

resorbiert waren (Vallée und Rossignol, Moussu), und daß andererseits Roux und Vallée den Beweis erbracht haben, daß die Vaccination auf subkutanem oder venösem Wege gegen die Infektion auf venösem Wege nicht schützt.

Dagegen bekunden die Versuche, über die ich berichtet habe, bis zur Evidenz, daß man durch die intestinale Absorption einer schwachen und einzigen Dosis von fein verteilten Tuberkelbacillen zugleich die totale Resorption der Bacillen im lymphatischen Drüsensystem und einen Zustand von Immunität erhalten kann derart, daß die Tiere wenigstens während eines Jahres den kräftigen Infektionen durch den Darmkanal widerstehen.

Zweifellos handelt es sich da in keiner Weise um eine Methode der Impfung, von der man wännen könnte Vorteil zu ziehen für die Bewahrung des Menschengeschlechtes vor der schrecklichen Geißel, die die Tuberkulose für sie ist. Aber die Forschung kann auf einem so schwierigen Gebiet nur in Etappen vorwärts schreiten. Seitdem Villemin und Robert Koch die Grundsteine des Gebäudes aufgeführt haben, auf denen wir weiterbauen, haben eine sehr große Anzahl Untersucher ihre Steine herbeigebracht. Andere werden folgen, und das Werk wird vollendet werden zum Ruhme und Heile der Menschheit.

---

[Aus dem staatlichen sero-therapeutischen Institut in Wien;  
Vorstand Prof. R. Paltauf.]

### **Ueber den Zusammenhang der Wertigkeit und Avidität bei Bakterienagglutininen.**

Von Dr. **M. von Eisler.**

Die Avidität der Antikörper, sowohl der normalen als der immunisatorisch erzeugten, deren Bedeutung bereits von P. Ehrlich und seiner Schule wiederholt betont wurde, war besonders in den letzten Jahren der Gegenstand eifrigen Studiums. Zu erwähnen wären hier namentlich die Untersuchungen von R. Kraus (1) über den Antitoxingehalt

normaler und Immunsera gegen das Gift des *Vibrio Nasik*. Die Antitoxine des Normalserums waren erst nach längerem Kontakte fähig, das Gift zu neutralisieren, die immunisatorisch erzeugten Antitoxine hingegen übten ihre Wirkung sofort aus. Landsteiner und Reich (2) haben durch Abspaltungsversuche an mit normalen und immunisatorisch erzeugten Agglutininen beladenen Blutkörperchen gezeigt, daß die letzteren in viel geringeren Mengen von den Blutkörperchen abgegeben werden als die ersteren, mithin zu diesen eine größere Avidität besitzen. Ferner wurde durch Kraus und Doerr (3) nachgewiesen, daß das Antitoxin gegen das Dysenterietoxin bei Ziegen im Verlaufe der Immunisierung eine Steigerung seiner Avidität erfährt. Bei systematischer Untersuchung der einzelnen Aderlässe ergab sich nämlich, daß das Serum im Anfange der Immunisierung das Gift bei Mischung *in vitro* neutralisierte, nicht aber bei gleichzeitiger getrennter Injektion. Später schützte das Serum auch bei getrennter Injektion, ohne aber auch schon einen kurativen Effekt zu entfalten. Dieser stellte sich erst ein, nachdem die Immunisierung noch längere Zeit fortgesetzt worden war. Ähnliche Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen normalem und Immunserum fanden Landsteiner und Heyrowsky (4) auch gegen Bakterienhämolysine. Ferner haben Landsteiner und Reich (5) ein höheres Aufnahmevermögen des Kaseins für Normal-, als für Immunagglutinine feststellen können. Außer den bisher erwähnten Arbeiten hat in letzter Zeit auch P. Th. Müller (6) sehr interessante Versuche über Aviditätsverhältnisse bei Hämolysinen und Agglutininen mitgeteilt. In der Zusammenfassung seiner Versuchsergebnisse kommt Müller zu dem Schlusse, daß in agglutinierenden Immunseren Antikörper verschiedener Avidität nebeneinander vorhanden sind. Diese Differenzen würden teils dadurch bedingt, daß in den einzelnen Immunisierungsperioden Antikörper verschiedener Avidität gebildet würden, teils dadurch, daß die einmal gebildeten Antikörper mit der Zeit eine Abschwächung ihrer Avidität erleiden. Müller hält es für wahrscheinlich, daß die Avidität der Antikörper mit der Intensität des Produktionsvorganges in Zusammenhang zu bringen sei, d. h. daß hochwertige Sera eine größere Avidität besitzen als nieder-

wertige. Dieses Verhalten würde mit dem von Ehrlich für die Wertbemessung des Diphtherieheilserums gemachten übereinstimmen. Nun sind aber schon von verschiedenen Seiten (Tizzoni, Behring, Roux, Cruveilhier) Zweifel erhoben worden, ob der Antitoxingehalt eines Serums ein exakter Maßstab für seine Heilkraft sei. Die jüngst veröffentlichten ausgedehnten Untersuchungen von R. Kraus und Schwoner (7) zeigen, daß der angenommene strenge Parallelismus zwischen Antitoxingehalt und Heilwert des Diphtherieserums nicht besteht resp. nicht bestehen muß.

Auf Anregung des Herrn Prof. Kraus selbst habe ich die Aviditätsverhältnisse bei Bakterienagglutininen nach dieser Richtung hin studiert und bin, wie ich gleich vorwegnehmen möchte, zu ähnlichen Resultaten gelangt. Die Schätzung der Avidität erfolgte in doppelter Weise, so wie es auch Müller getan hat, durch Berechnung des Absorptionskoeffizienten und der Anzahl der von den beladenen Bakterien abspaltbaren Agglutinineinheiten.

#### 1. Pferdesera.

Untersucht wurden zunächst die Sera dreier Pferde, welche mit Choleravibrionen vorbehandelt worden waren. Die Bakterienaufschwemmungen wurden in der Weise gewonnen, daß der Rasen einer großen Agarflasche mit 100 ccm Kochsalzlösung abgespült wurde. Zu 100 ccm Aufschwemmung wurde 0,5 ccm konzentrierter Karbolsäure zugesetzt. Die in dieser Weise bereiteten Aufschwemmungen konnten längere Zeit aufbewahrt werden, ohne daß Sedimentierung der Bakterien eintrat. Zur Auswertung der Sera wurde immer je 1 ccm einer solchen Aufschwemmung mit der entsprechenden Menge Serum versetzt und als Agglutinationseinheit diejenige Serummenge bezeichnet, welche eben imstande war, 1 ccm der Bakterienaufschwemmung vollkommen zu agglutinieren. Die Ablesung erfolgte immer nach zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank.

#### Versuch I am 12. März 1908.

Cholerasera, Kalif, Kamée und Lektor. Aderlässe vom 25. Febr. 1908. Die Auswertung der drei Sera ergab folgende Werte:

Kalif 0,003 ccm = 1 AE (Agglutinations-Einheit):

Kamée 0,0005 „ = 1 AE

Lektor 0,0003 „ = 1 AE.

Zum Versuche wurden von jedem der 3 Sera 500 AE mit je 5 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt und das Volumen auf 7 ccm gebracht. Die Röhrchen blieben zur Bindung des Agglutinins 2½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden die Bakterien scharf abzentrifugiert, die überstehende klare Flüssigkeit abgegossen, das Sediment mit Kochsalz gewaschen und hierauf mit 3 ccm Kochsalzlösung ½ Stunde lang bei 45° C digeriert. Dann wurde die Digestionsflüssigkeit wieder ganz klar zentrifugiert, von den Bakterien abgegossen und zum Versuche verwendet. In den Versuchsprotokollen soll die von den Bakterien abzentrifugierte Flüssigkeit, welche den Rest der nicht absorbierten Agglutinine enthält, mit Z bezeichnet werden, die Digestionsflüssigkeit, welche die von den Bakterien bei 45 wieder abgespaltenen Agglutinine enthält, mit D.

Der Grad der Agglutination ist mit komplett, fast komplett und partiell angegeben.

Kalif Z: 0,1 ccm kompl., 0,05 ccm fast kompl., 0,03 ccm part.

„ D: 0,3 „ „ 0,1 „ part.

Kamée Z: 0,2 „ „ 0,1 „ fast kompl. 0,05 „ „

„ D: 0,5 „ „ 0,3 „ „ „ 0,1 „ „

Lektor Z: 0,05 „ „ 0,03 „ „ „ 0,01 „ „

„ D: 0,2 „ „ 0,1 „ „ „ 0,05 „ „

Es wurden also von den dargebotenen 500 AE der drei Sera verschiedene Mengen gebunden und abgespalten:

Kalif: 430 gebunden, 10 abgespalten

Kamée: 465 „ 6 „

Lektor: 360 „ 30 „

oder die Absorptionskoeffizienten der 3 Sera sind:

Kalif: 0,86, Kamée 0,93, Lektor 0,72.

Es zeigt sich also, daß Kamée eine höhere Avidität besitzt als Kalif, daß aber Serum Lektor, das hochwertigste der drei Sera nicht nur geringere Avidität als Kamée, sondern sogar als Kalif besitzt, das einen 10mal niedrigeren Agglutinationstiter hat. Die geringere Avidität des Serum Lektor

kommt besonders deutlich zum Ausdruck, wenn man beachtet, daß trotz der viel geringeren Aufnahme von Agglutinin mehr abgespalten wurde als von Kamée und Kalif.

Versuch II am 30. April 1908.

In diesem Versuche wurden die Sera derselben 3 Pferde untersucht. Die Aderlässe waren von einem früheren Termin, nämlich vom 14. Januar 1908, der Zwischenraum zwischen dem Aderlasse und dem Tage des Versuches betrug  $2\frac{1}{2}$  Monate. Trotz des verhältnismäßig langen Termins war kein Rückgang der im Dunkeln und kühl aufbewahrten Sera festzustellen. Auch die Avidität hatte keine Aenderung erfahren. Der Versuch wurde genau wiederholt wie am 12. März. Da sich, abgesehen von ganz unwesentlichen Abweichungen, die ja in der Versuchsanordnung begründet sind, die gleichen Zahlen ergeben wie in Versuch I, kann von der detaillierten Wiedergabe dieses Versuches abgesehen werden.

In derselben Weise wurden zwei Typhus-Immunsera von den Pferden „Karl“ und „Janus“ untersucht. Bei wiederholten Auswertungen ergeben die beiden Sera den gleichen Titer, eher war das Serum Janus eine Spur schwächer.

Versuch III am 28. April 1908.

Es wurden je 500 AE von Typhusserum Karl und Janus (von Janus wurde sogar ein kleiner Ueberschuß zugesetzt), mit je 5 ccm Typhusaufschwemmung versetzt und in der gleichen Weise behandelt, wie es bereits in Versuch I beschrieben ist. Das Gesamtvolumen betrug in diesem Versuche 6,5 ccm. Die Digestion des Bakteriensedimentes erfolgte wieder in 3 ccm Kochsalzlösung. Je 0,002 ccm der beiden Sera enthielten 1 AE.

Karl Z: 0,1 kompl., 0,05 part.

„ D: 0,2 „ 0,1 „

Janus Z: 0,3 kompl., 0,2 fast kompl., 0,1 part.

„ D: 0,3 fast kompl., 0,2 part.

Es wurden also von den 500 AE gebunden resp. abgespalten:

Karl: 435 gebunden, abgespalten 15

Janus: 478 gebunden, abgespalten 9.

20\*

Die Absorptionskoeffizienten der beiden Sera sind somit:  
Karl 0,87, Janus 0,95.

Mithin besitzt von den zwei gleich hochwertigen Seris (eher ist Janus schwächer) Janus eine deutlich stärkere Avidität als Karl.

Es wurde auch untersucht, ob die Erhitzung der Bakterien einen Einfluß auf die Aviditätsverhältnisse ausübt. Von einer in der gewöhnlichen Weise hergestellten Choleraaufschwemmung wurde ein Teil 1 Stunde auf 60° C erhitzt, ein Teil durch 10 Minuten gekocht. Je 500 AE des Serums Kamée wurden mit je 5 ccm der in verschiedener Weise vorbehandelten Aufschwemmungen versetzt und dann wie gewöhnlich verfahren. Das Bindungsvermögen der auf 60° erhitzten und gekochten Bakterien hatte sich nicht geändert. In allen 3 Proben waren die Absorptionskoeffizienten zwischen 0,92—0,94. Auch bei den Abspaltungsversuchen zeigte sich kein Unterschied.

## 2. Kaninchensera.

In ähnlicher Weise wie die Pferdesera, wurden auch agglutinierende Kaninchensera untersucht. Kräftige Kaninchen von ca. 2500—3000 g erhielten alle 7—8 Tage intraperitoneal je 1 ccm karbolisierter Cholerabakterienaufschwemmung. Unmittelbar vor der 3. Injektion, also 7 Tage nach der 2. Einspritzung wurde den Tieren aus der Ohrvene Blut genommen. Vor jeder weiteren Injektion wurde der Aderlaß wiederholt. Die Sera wurden immer am Tage nach dem Aderlasse zum Versuche verwendet. Die fortlaufend untersuchten Sera von 4 Kaninchen sind mit den Nummern 1—4 bezeichnet. Die Auswertung der beiden ersten Aderlässe ergab gleiche Werte. Die 4 Sera agglutinierten in folgenden Verdünnungen.

### Versuch IV am 19. Mai 1908:

- 1) 0,01 ccm = 1 AE
- 2) 0,003 „ = 1 AE
- 3) 0,003 „ = 1 AE
- 4) 0,01 „ = 1 AE.

Im Versuche wurden 500 AE mit 5 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt. Das gewaschene Bakteriensediment wurde zur Digestion in 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt.



In Anbetracht der zur Zahl der dargebotenen Agglutinin-einheiten großen Bakterienmenge wurden hohe Absorptions-koeffizienten erreicht. Die Unterschiede zwischen den 4 Seris waren keine beträchtlichen :

- |    |                        |      |
|----|------------------------|------|
| 1) | Absorptionskoeffizient | 0,9  |
| 2) | "                      | 0,94 |
| 3) | "                      | 0,85 |
| 4) | "                      | 0,9  |

Serum 2 zeigte die stärkste Avidität; es war hochwertiger als 1 und 4, aber niedriger als Serum 3.

Beim 3. Aderlasse standen mir nur 3 Kaninchen zur Verfügung; das Kaninchen No. 2 war eingegangen.

#### Versuch V am 27. Mai 1908.

Die Auswertung der 3 Sera ergab:

- |    |       |   |       |
|----|-------|---|-------|
| 1) | 0,01  | = | 1 AE  |
| 3) | 0,001 | = | 1 AE  |
| 4) | 0,01  | = | 1 AE. |

Serum 3 war also gegen den 2. Aderlaß ungefähr um das Doppelte des Wertes gestiegen. Je 500 AE wurden mit 5 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt und das Volumen mit Kochsalz auf 10 ccm gebracht. Das Volumen der Digestions-flüssigkeit betrug 3 ccm.

- |    |        |         |     |              |      |       |
|----|--------|---------|-----|--------------|------|-------|
| 1) | Z: 0,3 | kompl., | 0,1 | fast kompl., | 0,05 | part. |
|    | D: 0,5 | "       | 0,3 | "            | 0,1  | "     |
| 3) | Z: 0,3 | "       | 0,1 | "            | 0,05 | "     |
|    | D: 0,5 | "       | 0,3 | "            | 0,1  | "     |
| 4) | Z: 0,3 | "       | 0,1 | part.        |      |       |
|    | D: 0,5 | "       | 0,3 | fast kompl., | 0,1  | part. |

Die Absorptionskoeffizienten betragen für alle 3 Sera 0,92. Ebenso war auch die Anzahl der bei der Digestion abge-spaltenen Agglutinationseinheiten in allen 3 Fällen ungefähr 6.

#### Versuch VI am 28. Mai 1908.

In diesem Versuche wurden je 200 AE mit 1 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt, da man daran denken konnte, daß bei der im Verhältnis zum Agglutinin großen Bakterienmenge Aviditätsunterschiede nicht zum Ausdrucke

kommen könnten. In diesem Versuche zeigte sich entsprechend der relativ größeren Agglutininmenge ein kleiner Absorptionskoeffizient, welcher aber für alle 3 Sera gleich war und 0,75 betrug. Die Zahl der abgespaltenen Agglutinationseinheiten war 8.

#### Versuch VII am 7. Juni 1908.

Der nächste Aderlaß ergab folgende Agglutinationswerte:

- 1) 0,005 = 1 AE
- 3) 0,001 = 1 AE
- 4) 0,005 = 1 AE.

Serum 1 und 4 hatten also an Agglutinationskraft zugenommen. Der Aviditätsversuch wurde genau so durchgeführt, wie es in Versuch V beschrieben ist. Die Absorptionskoeffizienten betrugen in diesem Versuche wieder für alle 3 Sera 0,85. Abgespalten wurden 6 AE. Es war also in allen 3 Seris durch die Fortsetzung der Injektion eine Steigerung der Avidität erfolgt; bei allen dreien war die Avidität ganz gleich, obwohl Serum 3 einen 5mal höheren Agglutinationswert besaß als 1 und 4.

#### Versuch VIII am 15. September 1908.

Die Sera der Aderlasse vom 5. Juni waren im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden. Nach fast 3 $\frac{1}{2}$  Monaten wurde ein Versuch gemacht, ob sich vielleicht jetzt Unterschiede in der Avidität nachweisen ließen. Die Auswertung der Sera ergab einen nicht unbeträchtlichen Rückgang ihres Agglutinationsvermögens:

- 1) 0,02 ccm = 1 AE
- 3) 0,002 „ = 1 AE
- 4) 0,02 „ = 1 AE.

Zur Aviditätsbestimmung wurden je 200 AE mit 1 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt. Die Absorptionskoeffizienten waren folgende:

- 1) 0,5, 3) 0,75, 4) 0,75.

Abgespalten wurden von allen 3 Seris je 5 Agglutinationseinheiten. Serum 1 zeigte also jetzt geringere Avidität als Serum 3. Serum 4 aber war, obwohl es 10mal geringere Agglutinationskraft als 3 besaß, in bezug auf Avidität gleich.

Versuch IX am 16. September 1908.

Schließlich wurde den Kaninchen, welche am 25. Juni noch eine Injektion erhalten und seitdem nicht mehr behandelt wurden, am 15. September ein Aderlaß gemacht. Auch im Tierkörper findet bekanntlich ein Rückgang der Avidität und eventuell auch der Wertigkeit statt, wie zuerst von Kraus gezeigt wurde.

Auch Müller hat Versuche über die Abschwächung der Avidität bei Aufenthalt des Serums im Tierkörper gemacht. Die Auswertung der 3 Sera ergab:

1) 0,08 ccm = 1 AE

3) 0,02 „ = 1 AE

4) 0,08 „ = 1 AE.

Die Absorptionskoeffizienten betrugen für alle 3 Sera 0,5.

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß eine unbedingte Abhängigkeit der Avidität von der Wertigkeit der Sera für die Agglutinine nicht besteht. Wenn sich auch häufig hochwertige Sera finden, die eine größere Avidität besitzen als niederwertige (Müller), so hat man auch nicht selten Gelegenheit, wie aus meinen Versuchen hervorgeht, bei einem hochwertigen Serum die gleiche oder sogar eine geringere Avidität zu beobachten als bei einem niederwertigen. P. Th. Müller stellt am Schlusse seiner Arbeit eine Uebersichtstabelle zusammen, in der gezeigt werden soll, daß die Sera mit wachsendem Agglutiningehalt auch an Avidität zunehmen. Wenn man bloß die aus den einzelnen Versuchen erhaltenen Durchschnittszahlen berücksichtigt, erscheint die Schlußfolgerung Müllers allerdings berechtigt. Beim Eingehen auf die einzelnen Versuchszahlen finden sich aber auch in den Protokollen von Müller Fälle, die den angenommenen Zusammenhang nicht zeigen. So z. B. sind unter den Seris, die 100—1000 AE enthalten, unter 11 Seris 4 mit größerer Avidität, als das die geringste Avidität aufweisende Serum der Gruppe mit 2000—10 000 AE. 3 weitere Sera der ersten Gruppe haben ungefähr den gleichen Absorptionskoeffizienten (0,17 gegen 0,18) wie das erwähnte Serum

der nächst höheren Gruppe. Auch glaube ich, daß das Vorgehen Müllers, die Sera von 5 immunisierten Kaninchen untereinander ohne weiteres zu vergleichen, zu Irrtümern Anlaß geben kann. So enthält das Serum des Kaninchens I nach der 1. Injektion 3,3 AE per 1 ccm, das Serum des Kaninchens V aber 333 AE, dasselbe Serum nach der 2. Injektion 2500, Kaninchen I aber nur 600 AE. Das Serum des Kaninchens II enthält nach der 3. Injektion 5000 AE. Bei Darbietung von 100 AE ergibt sich ein Absorptionskoeffizient von 0,73 erst bei Darbietung von nur 10 AE steigt der Koeffizient auf 0,88. Dagegen hat das Serum des Kaninchens I nach der 2. Injektion bloß 666 AE in 1 ccm, ist also fast 8mal schwächer als das Serum des Kaninchens II. Trotzdem ist der Absorptionskoeffizient bei Darbietung von 66,6 AE 0,83, also relativ gewiß höher als bei Serum des Kaninchens II. Solche Verhältnisse sprechen doch einigermaßen dagegen, daß die Annahme von dem strikten Zusammenhang zwischen Wertigkeit und Avidität eines Serums ganz allgemeine Gültigkeit hat.

#### Zusammenfassung.

- 1) Die Wertigkeit eines agglutinierenden Serums ist kein Maßstab für seine Avidität.
- 2) Die Avidität muß daher als eine mit der Wertigkeit nicht in direktem Zusammenhange stehende Eigenschaft des Serums angesehen werden.

#### Literatur.

- 1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 34.
- 2) Centralbl. f. Bakt., Bd. 39.
- 3) Wien. klin. Wochenschr., 1905.
- 4) Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, 1907.
- 5) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 58, 1908.
- 6) Archiv f. Hyg. 1908, Bd. 69, und Centralbl. f. Bakt., 1908, Bd. 46.
- 7) Centralbl. f. Bakt., 1908, Bd. 47.
- 8) Centralbl. f. Bakt., Bd. 34.

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien.  
Vorstand: Prof. R. Paltauf.]

### Ueber Adsorption des filtrierbaren Virus.

Von Prof. **R. Kraus**, Dr. **v. Eisler** und Prof. **Fukuhara** (Osaka).

Unsere Untersuchungen wurden zunächst in der Absicht ausgeführt, einige Aufklärung über das Schicksal des Lyssavirus im infizierten Organismus, namentlich über den Abwehrmechanismus des tierischen Körpers gegen diese Erkrankung zu erhalten. Da sowohl das Virus der Lyssa als auch die anderen zu den sogenannten invisiblen Virusarten gezählten Krankheitserreger zu den typischen Zellparasiten gehören, richtete sich unsere Aufmerksamkeit zunächst auf die Zellen und zwar vor allem auf die Leukocyten, da wir an die Möglichkeit dachten, daß die weißen Blutkörperchen das Virus aufnehmen und unschädlich machen könnten. Unsere Versuche haben aber diese Annahme nicht bestätigt, sondern haben gezeigt, daß die Leukocyten, sowohl der für Lyssa empfänglichen als auch der für die Wut unempfänglichen oder schwer empfänglichen Tiere nicht imstande sind, das Virus zu vernichten.

#### Versuch.

Je 0,5 ccm Hühner-, Tauben- und Kaninchenblut wurden in 1,5-proz. Lösung von Natriumcitrat aufgefangen. Die Röhrchen wurden einige Minuten zentrifugiert und hierauf die obere Schicht, welche die Hauptmenge der weißen Blutkörperchen enthielt, abpipettiert und in 0,85-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Nach zweimaligem Waschen der Leukocyten mit Kochsalzlösung wurde das Sediment in 0,5 ccm Kochsalzlösung aufgenommen und mit je 0,5 ccm Virus fixe, welches im Verhältnisse 1:100 verdünnt und durch Papier filtriert war, versetzt und 4 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Dann wurden mit den Mischungen Kaninchen subdural injiziert.

Virus fixe + Hühnerleukocyten, Injektion am 27. März 1908.

Kaninchen No. 441 Lyssa 3. April, † 5. April

„ „ 442 „ 5. „ † 6. „

Virus fixe + Taubenleukocyten, Injektion am 27. März 1908.

Kaninchen No. 443 † 3. April ohne Lyssasymptome

„ „ 439 Lyssa 4. April, † 6. April.

Virus fixe + Kaninchenleukocyten, Injekt. am 27. März 1908.

Kaninchen No. 438 Lyssa 5. April, † 7. April

„ „ 440 „ 4. „ † 6. „

Bei der weiteren Untersuchung anderer tierischer Zellen konnten wir aber beobachten, daß auch verschiedene andere Zellarten das Lyssavirus aufzunehmen vermögen. Der folgende Versuch wurde mit Meerschweinchenorganen gemacht.

#### Versuch.

Ein Meerschweinchen wurde entblutet von dem Gehirn, der Leber, Milz, dem Knochenmark und dem Blute je 1 g mit 5 ccm Kochsalzlösung verrieben. Von dem Organbrei resp. der Blutaufschwemmung wurden je 0,5 ccm mit 0,2 ccm Virus fixe (Verdünnung 1:100 und durch Papier filtriert) versetzt, und eine Stunde bei 36° gehalten. Dann wurden die Zellen dreimal mit Kochsalzlösung gewaschen, das Sediment in 0,5 ccm Kochsalzlösung aufgenommen und von dieser Aufschwemmung Kaninchen subdural injiziert.

Leber + Virus fixe, Injektion am 19. April 1908.

Kaninchen No. 427 † 23. April

„ „ 240 Lyssa 27. April, † 30. April.

Milz + Virus fixe, Injektion am 19. April 1908.

Kaninchen No. 431 † 24. April

„ „ 165 30. April gesund.

Knochenmark + Virus fixe, Injektion am 19. April 1908.

Kaninchen No. 74 Lyssa 26. April

„ „ 370 † 23. April.

Gehirn + Virus fixe, Injektion am 19. April 1908.

Kaninchen No. 337 Lyssa 27. April, † 30. April

„ „ 413 „ 28. „ † 30. „

Blut + Virus fixe, Injektion am 19. April 1908.

Kaninchen No. 415 Lyssa 27. April, † 30. April

„ „ 416 30. April ?, † 1. Mai.

Die verschiedenen Zellarten hatten also das Virus ebenso aufgenommen wie die Leukocyten

(gebunden), und trotz des dreimaligen Waschens festgehalten. Kontrolltiere, welche mit dem letzten Waschwasser injiziert wurden, blieben gesund. Es war danach wahrscheinlich, daß es sich nicht um eine aktive Aufnahme des Virus handeln dürfte, sondern um einen Vorgang, der mit der Adsorption kolloidaler Stoffe in Zusammenhang zu bringen sei.

Wir gingen deswegen daran, verschiedene Substanzen, die als gute Adsorbentien bekannt sind, auf ihr Bindungsvermögen für das Lyssavirus zu prüfen. Nach den vorhergegangenen Versuchen mit tierischen Zellen konnten wir schon mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Gelingen dieser Versuche rechnen, da ja Adsorptionsversuche schon für die verschiedensten kolloidalen Stoffe durchgeführt worden sind, nicht nur auf dem Gebiete der Färbetechnik, sondern auch auf biologischem Gebiete, so die Versuche von v. Dungern (1) und Ehrlich und Sachs (2) über Bindung des Komplementes durch Hefe, und namentlich die Untersuchungen von Landsteiner und seinen Mitarbeitern. Landsteiner und Uhlirz (3) untersuchten die Adsorption verschiedener Eiweißkörper und fanden, daß die leichter ausfällbaren Eiweißfraktionen, wie die Globuline stärker gebunden werden als die schwerer fällbaren Albumine. Die Autoren neigen zu der Annahme, daß die Adsorptionsvorgänge von chemischen resp. elektrischen Kräften, die ja ihrerseits wieder von der chemischen Reaktion abhängig sind, beeinflußt werden. Bei der Adsorption der amphoteren Eiweißkörper ist dieses Verhalten weniger ausgesprochen, kommt jedoch in Versuchen von Suida (4) sehr deutlich zum Ausdruck, der fand, daß Kaolin und Talk sich vermöge ihrer sauren Beschaffenheit intensiv mit basischen Farbstoffen färben, wogegen z. B. Karbonate und basische Oxyde mit Farbbasen nahezu unfärbbar sind. Es dürfte sich also um salzartige Verbindungen zwischen dem Adsorbens und dem zu adsorbierenden Stoffe handeln. In Fortsetzung dieser Versuche konnten Landsteiner und Stanković (5) feststellen, daß das Eiweiß und das eiweißartige Agglutinin aus Ricin- und Abrinlösungen von festen Proteinsubstanzen als Fibrin, Kasein, Seide gebunden wird, und sich durch Erwärmen, ferner durch Behandlung mit Säuren und Basen teilweise abspalten läßt.

Durch Behandlung des Kaseins mit Acetanhydrid, Alkohol, Schwefelsäure, Acetylchlorid wurde das Bindungsvermögen für Abrin und ebenso für basische Farbstoffe verringert, für saure dagegen erhöht. Dieses Resultat wird von den Verfassern auf die Inaktivierung saurer Gruppen im Kasein bezogen und zur Stütze der schon in der früheren Arbeit ausgesprochenen Ansicht, daß es sich um salzartige Verbindungen der beiden Körper handle, herangezogen. Endlich wurde von Landsteiner und Stanković (6) die Bindung der Serumkomplemente durch verschiedene organische und anorganische kolloidal gelöste oder suspendierte Stoffe gezeigt.

Vor kurzem haben Michaelis (7), sowie Michaelis und Ehrenreich (8) Versuche über Adsorption von Fermenten durch anorganische Kolloide veröffentlicht. Die Untersuchungen umfassen Speicheldiastase, pflanzliche Diastase, Pepsin, Trypsin, Lab und Invertin. Als Adsorbentia kamen Kaolin, Talk, Tonerde, Eisenhydroxyd und Kohle zur Verwendung. In diesen Versuchen kam wieder das bereits von Suida und Landsteiner beobachtete Verhalten zum Ausdruck, daß Körper von saurer Beschaffenheit, wie Kaolin, vorwiegend basische, Körper von basischer Beschaffenheit, wie Tonerde, hauptsächlich säureartige Stoffe adsorbieren. Kohle gibt keine so eindeutigen Resultate, denn sie bindet sowohl Farbbasen als auch saure Farbstoffe. Während Freundlich die Adsorptionsercheinungen ausschließlich infolge Herabsetzung der Oberflächenspannung durch das Adsorbens erklären will, nehmen Michaelis und Ehrenreich elektrochemische Kräfte für die Adsorptionsercheinungen an. Das Adsorbens besitzt eine hohe elektrische Potentialdifferenz gegen die umgebende Flüssigkeit, welche durch die Adsorption des gelösten Stoffes vermindert wird.

Unsere Versuche mit Lyssavirus wurden zunächst mit Knochenkohle ausgeführt. Die mehrmals wiederholten Versuche ergaben außerordentlich konstante Resultate, die Versuchsanordnung soll im folgenden beschrieben werden.

#### Versuch.

1 g Knochenkohle wurde in 5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und sterilisiert. Das Virus wurde zu den Versuchen im Verhältnisse 1:100 mit Kochsalz verdünnt



und durch Papier filtriert. 0,5 ccm der Kohlenaufschwemmung wurden mit 0,2 ccm des verdünnten Virus 1 Stunde bei 37° digeriert und dann 5—6mal mit Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wurde in 0,5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zu Infektionsversuchen benutzt. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle das letzte Waschwasser Kaninchen injiziert.

Kohle + Virus fixe, subdurale Injektion am 23. Mai.

Kaninchen No. 264 am 2. Juni Lyssa

„ „ 411 † am 29. Mai ohne Lyssa

„ „ 253 am 4. Juni Lyssa.

Waschwasser subdurale Injektion am 23. Mai.

Kaninchen No. 439 gesund am 8. Juni

„ „ 290 gesund „ 8. „

Bei dem vorhergehenden Versuche wurde das Virus fixe der Impfanstalt gegen Wut in Wien verwendet. Der folgende Versuch wurde mit einem Virus fixe ausgeführt, das von Fermi zu seinen subkutanen Infektionsversuchen mit Erfolg benutzt wurde.

Im Gegensatze zu diesem Virus von Fermi, welches ebenso gut subkutan wie subdural eingebracht wirksam war, ist das Virus fixe des Wiener Institutes von der Subcutis aus häufig wirkungslos.

#### Versuch.

Die Versuchsanordnung war genau dieselbe wie im früher beschriebenen Experimente, nur wurde das Sediment in 4 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und je 1 ccm Kaninchen subkutan injiziert.

Kohle + Virus Fermi, Injektion am 17. Sept.

Kaninchen No. 488 am 22. Sept. Lyssa

„ „ 74 „ 24. „ „

„ „ 478 „ 29. „ „

„ „ 498 „ 22. „ „

Letztes Waschwasser.

Kaninchen No. 372 am 9. Sept. gesund

„ „ 118 „ 9. „ „

Das adsorbierte Virus haftet ziemlich fest an der Kohle, da diese auch nach 6-maligem Waschen

noch infektionstüchtig war. Wir versuchten nun das an die Kohle fixierte Virus wieder frei zu machen.

#### Versuch.

0,5 g Kohle in 4 ccm Kochsalzlösung wurden mit 1 ccm des filtrierten und 1:100 verdünnten Virus fixe 1 Stunde bei 36° digeriert, und dann die Kohle 5mal mit Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wurde in 2 ccm Kochsalzlösung aufgenommen und 40—45 Minuten in einem Wasserbade von 42° C erwärmt. Die obere klare Flüssigkeit wurde zur eventuellen Entfernung kleinster Kohlenpartikelchen durch Papier filtriert, und mit dem Filtrate Kaninchen subdural injiziert.

Subdurale Injektion am 23. Sept. 1908.

Kaninchen No. 253 † am 30. Sept. ohne Lyssasymptome

„ „ 221 am 2. Okt. Lyssa

„ „ 431 am 30. Sept. Lyssa.

Bei den anderen Abspaltungsversuchen gebrauchten wir für Filtration der Digestionsflüssigkeit Papierfilter aus dichtem sogenannten schwedischen Filtrierpapier. Auch mit diesem Filtrate gelang es noch zu infizieren, wenn auch die Resultate nicht mehr konstant waren. So erkrankten z. B. in einem solchen Versuche von drei subdural injizierten Kaninchen bloß eines an Lyssa. Offenbar war die Menge des Virus schon so gering, daß wir uns an der Grenze der wirksamen Verdünnung befanden. Jedenfalls aber geht aus diesen Versuchen hervor, daß es gelingt, einen Teil des an die Kohle gebundenen Virus durch Erwärmen wieder frei zu machen.

Ueber die Konservierbarkeit des an die Kohle gebundenen Virus läßt sich nach unseren Versuchen folgendes sagen. Das in Glyzerin aufbewahrte Kohlenvirus war nach 8 Tagen noch infektiösfähig. Ein nach 18-tägiger Aufbewahrung vorgenommener Versuch ergab ein negatives Resultat. Bemerkenswert scheint die lange Lebensfähigkeit des getrockneten Virus. Wir trockneten die mit Virus beladene und gewaschene Kohle bei 36° C und bewahrten das getrocknete Sediment weiter bei dieser Temperatur auf. Nach 9 Tagen gelang es noch, zwei von drei injizierten Kanin-

chen mit Lyssa zu infizieren. Eine nach 12 und 16 Tagen entnommene Probe war nicht mehr infektiös. Dagegen scheint das Kohlenvirus gegen höhere Temperaturen wenig resistent zu sein, denn schon einstündiges Erhitzen auf 56° C vernichtete es vollständig.

Versuche, irgendeine Reaktion für das an die Kohle gebundene Virus ausfindig zu machen, haben zu keinem Resultate geführt. Es wurden verschiedene Blutagarplatten, Fuchsin- (Endo), Methylgrün-, Lackmusmilchzuckerplatten mit dem Kohlenvirus bestrichen, ohne daß irgendeine Veränderung wahrgenommen werden konnte, ebensowenig tritt Reduktion des Methylenblau (geprüft nach der Methode Neisser und Wechsberg) ein. Gelatine wurde nicht verflüssigt, auch ein erhöhtes Fettspaltungsvermögen im Vergleiche zu mit normalem Gehirn beladener Kohle war nicht festzustellen.

Bei allen bisherigen Versuchen haben wir als Adsorbens Kohle benutzt, aber auch andere als Adsorbentien verwendete Substanzen haben sich gut bewährt, so Kaolin, Aluminiumhydroxyd und Quarzsand. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei der Adsorption mit Kohle.

#### Versuch.

Kaolin + Virus fixe, subdurale Injektion am 2. Nov.

Kaninchen No. 209 am 7. Nov. Lyssa, † 9. Nov.

„ „ 467 —

Aluminiumhydroxyd + Virus fixe subdurale Injektion am 2. Nov.

Kaninchen No. 484 am 8. Nov. Lyssa

„ „ 349 „ 9. „ „

„ „ 28 „ 9. „ „

Quarzsand + Virus fixe, subdurale Injektion am 9. Nov.

Kaninchen No. 464 am 16. Nov. Lyssa.

„ „ 282 † am 14. Nov. ohne Lyssa

„ „ 336 am 17. Nov. gesund.

Die mit den Waschwässern injizierten Kontrolltiere blieben gesund.

Es zeigt sich also, daß das Lyssavirus vor den verschiedensten Stoffen nicht nur von Kohle,

sondern auch von solchen mit saurer Beschaffenheit (Kaolin) und Basencharakter (Aluminiumhydroxyd) adsorbiert wird. Das Lyssavirus zeigt also, wie es dem amphoteren Eiweißcharakter entspricht, bezüglich seiner Adsorption das gleiche Verhalten, wie es von Michaelis und Ehrenreich (10) für Speicheldiastase und Trypsin gefunden wurde.

Im Anschlusse an die Versuche mit Lyssavirus soll auch noch über Adsorptionsversuche mit dem Virus der Hühnerpest und mit Vaccine berichtet werden.

#### Versuch.

1 g Kohle wurde in 5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, das Gehirn eines an Hühnerpest gestorbenen Huhnes wurde zerrieben, mit Kochsalz im Verhältnisse 1:10000 verdünnt und durch Papier filtriert. 0,5 ccm der Kohlenaufschwemmung wurden mit 0,2 ccm des Virus 1<sup>h</sup> bei 36° C gehalten, dann zentrifugiert und das Sediment 6mal mit Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wurde nach dem Waschen in 2 ccm Kochsalz aufgenommen und einem Huhne intramuskulär injiziert, ebenso das letzte Waschwasser.

Kohle + Virus, weißes Huhn injiziert am 9. Mai, † am 11. Mai.

Waschwasser, gelbes Huhn injiziert am 9. Mai, gesund am 20. Mai.

Die öfters wiederholten Versuche ergaben stets dasselbe Resultat. Erwähnt soll hier auch werden, daß Rosenthal (9) in einer Arbeit über Filtration des Hühnerpestvirus auch einen Versuch über Adsorption dieses Virus durch Kaolin anführt. Doch ist das Resultat dieses einen Versuches nach des Autor eigenem Urteile unsicher.

Schließlich wurde auch die Adsorption der Vaccine durch Kohle versucht.

#### Versuch.

Die käufliche Vaccine wurde im Verhältnis 1:10 mit Kochsalzlösung verdünnt. 2 ccm dieser Verdünnung wurden mit 0,5 g Kohle in 3 ccm Kochsalz 1<sup>h</sup> bei 36° C digeriert, hierauf zentrifugiert und das Sediment noch 4mal gewaschen.

Mit dem Sedimente und dem letzten Waschwasser wurden Kaninchen corneal geimpft am 17. Sept.

Sediment - Kaninchen No. 189 am 20. Sept. Cornea trüb

„ „ „ 449 „ 19. „ „ „  
Letztes Waschwasser, Kaninchen No. 448 am 20. Sept.  
ohne Veränderung.

Letztes Waschwasser, Kaninchen No. 322 am 20. Sept.  
ohne Veränderung.

Vom erkrankten Auge des Kaninchens No. 189 wurden am 21. Sept. 2 gesunde Kaninchen corneal infiziert. Bei beiden trat am 24. Sept. Trübung der Cornea auf. (Bei histologischer Untersuchung konnten bisher Guarnierische Körperchen in der Cornea nicht gefunden werden.) Kontrollversuche hatten uns gezeigt, daß das Skarifizieren der Cornea und Einbringen von nicht mit Vaccine beladenen Kohlenpartikelchen keine solchen Veränderungen hervorruft.

#### Zusammenfassung.

Nach den angeführten Versuchen gelingt es somit, die zu den sogenannten invisiblen Virusarten gehörigen Krankheitserreger (Lyssa-Hühnerpest-Virus) nicht nur an Zellen, sondern auch an anorganische Substanzen zu fixieren.

Auf diesem Wege, welcher der Filtration durch Bakterienfilter vorzuziehen wäre, wäre es nicht aussichtslos, eine Reinigung des Virus zu versuchen.

#### Literatur.

- 1) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr., 1900.
- 2) Ehrlich und H. Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1902.
- 3) Landsteiner und Uhlirz, Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. 40, H. 2.
- 4) Serida, Monatshefte f. Chemie, 1904.
- 5) Landsteiner und Stanković, Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. 41, H. 1.
- 6) — —, Centralbl. f. Bakteriologie, Bd. 42, H. 4.
- 7) Michaelis, Biochem. Zeitschr., 1908.
- 8) Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zeitschr., 1908.
- 9) Rosenthal, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 60.
- 10) Michaelis und Ehrenreich, l. c.

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten  
der Universität Bern; Direktor: Prof. Dr. W. Kolle.]

### **Untersuchungen über die Wassermann-Neisser-Brucksche Reaktion bei Syphilis.**

Von

Privatdoz. Dr. med. **P. Schatilloff** und Dr. med. **M. Isabolinsky**,  
aus Charkow. Mitarbeiter am Institut.

Die Frage über die Bedeutung der Wassermannschen Reaktion und ihre Verwertbarkeit bei der Diagnose der Syphilis ist namentlich in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Arbeiten und lebhafter Kontroversen gewesen. Es würde jedoch zu weit führen, wenn wir an dieser Stelle eine eingehende Würdigung der einschlägigen Literatur geben wollten, weshalb wir uns, ehe wir zur Mitteilung unserer Versuche übergehen, mit einer kurzen Skizzierung des Entwicklungsganges dieser Frage nach der theoretischen und praktischen Seite, soweit sie für die folgenden Untersuchungen von Interesse ist, begnügen.

Wie bekannt, haben im Jahre 1906 Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht auf Grund ausgedehnter Versuche als erste gezeigt, daß im Serum von syphilitischen Menschen antiluetische Stoffe, wie man damals annahm, spezifischer Natur gebildet werden, die, in der Bordet-Gengouschen Versuchsanordnung mit einem aus syphilitischen Organen gewonnenen Antigen zusammengebracht, deutliches Komplementbindungsvermögen erkennen lassen. Detré hat nachgewiesen, daß diese Stoffe sich in gleicher Weise im Blute von syphilitischen Affen vorfinden. Wassermann und Bruck haben dann zahlreiche Untersuchungen an Kranken angestellt, durch welche sie die klinische Brauchbarkeit der Methode erwiesen. Wassermann, Neisser und Bruck fanden bei Kranken mit manifesten syphilitischen Erscheinungen einen positiven Ausfall der Reaktion in 90 Proz. der Fälle, bei solchen im latenten Stadium der Krankheit in 50 Proz. der untersuchten Fälle. Citron, der die diagnostischen Leistungen der Wassermannschen Reaktion bei einem mehr als 1000 Fälle umfassenden klinischen Material einer Prüfung unterzog, stellte fest, daß

diese Reaktion bei vollkommen gesunden, normalen Menschen stets einen negativen Ausfall zeigt, daß bei syphilitischen oder syphilisverdächtigen Individuen ein positives Ergebnis in 70 Proz. aller Fälle erreicht wird und daß eine große Zahl von Paralytikern und Tabetikern sowohl bei Untersuchungen von Blut wie von Cerebrospinalflüssigkeit ebenfalls einen positiven Ausfall der Reaktion aufweisen. Diese umfassenden Untersuchungen haben Citron von der unzweifelhaften Brauchbarkeit der Reaktion für klinische Zwecke überzeugt. Ferner ist er dabei zu der Ansicht gelangt, daß der Gehalt des Blutes an komplementverankerenden Stoffen unter dem Einfluß einer antiluetischen Behandlung allmählich abnimmt, um schließlich vollkommen zu verschwinden.

Wie different auch die Meinungen der Autoren wegen der Frage nach dem Wesen dieser Reaktion sind, so herrscht doch mit Bezug auf ihre diagnostische Verwertbarkeit volle Uebereinstimmung. Wir verweisen in dieser Beziehung auf die Arbeit von Fischer und Meier, die unter 114 untersuchten Fällen einen positiven Ausfall der Reaktion in 84 Proz. gesehen haben. Die Autoren geben der Meinung Ausdruck, daß einzig und allein der positive Ausfall Bedeutung besitzt, während bei negativem Verlauf der Untersuchung die Diagnose als unentschieden zu betrachten ist. Grosz und Volk haben diese Reaktion auf ihre Spezifität in 232 Fällen untersucht und sind dabei zu dem gleichen Prozentsatz positiver Ergebnisse wie die anderen Autoren gelangt.

Franz Behring ist bei 896 untersuchten Fällen zu guten Resultaten gekommen, namentlich bei Lues II, wo nur ein negativer Ausfall von 2 Proz. zu verzeichnen war. In ähnlichem Sinne über die Verwertbarkeit der Wassermannschen Reaktion bei der Diagnose der Syphilis sprechen sich eine ganze Reihe neuerer Arbeiten aus. Ihr Wert als diagnostisches Hilfsmittel ist völlig sichergestellt.

Eine praktisch und theoretisch wichtige Feststellung wurde von den Autoren gemacht, die fanden, daß auch bei Verwendung von Extrakten, die aus normalen Organen des Menschen und der Tiere stammen (Levaditi, Michaelis, Landsteiner-Müller und Pötzl), und bei Benutzung von Lecithin als Antigene (Porges und Meier) ein positiver Ausfall der Reaktion zu beobachten ist. Nach diesen Unter-

suchungen soll das syphilitische Antigen zu den lipoiden Substanzen gehören und nicht direkt auf die gleichzeitige Anwesenheit von Spirochäten hinweisen. In Uebereinstimmung mit dieser Ansicht steht der Befund von Benecke, nach welchem bei kongenitaler Syphilis in der Leber sehr viel lipoide Substanzen gefunden werden. Die bisher als Antigene bezeichneten Aufschwemmungen oder Extrakte würden also keine Antigene in dem gebräuchlichen Sinne sein. In Zusammenhang mit dieser Frage muß kurz auf die Mitteilung über Präzipitationserscheinungen der luetischen Sera mit Lecithinlösungen hingewiesen werden. Einige Autoren behaupten, daß die Präzipitationsreaktion parallel der Komplementbindungsreaktion verläuft, und daß eine vorherige Ausflockung syphilitischer Sera mittels Lecithins ihr Komplementbindungsvermögen abschwächt oder gänzlich aufhebt (Siegfried Grosz und Richard Volk). Andere Forscher behaupten im Gegensatz dazu, daß die Lecithinausflockung absolut nicht parallel mit der Reaktion der Komplementbindung einhergeht (M. v. Eisler). Wie dem auch sein mag, so ist die Frage der Präzipitation syphilitischer Sera durch das Lecithin und ihre Beziehungen zur Wassermannschen Reaktion bis jetzt noch keineswegs geklärt. Wie wir schon eingangs erwähnt haben, hat Michaelis, entgegengesetzt der Meinung von Plaut, nachgewiesen, daß die Reaktion sowohl bei der Verwendung von normalen Organen eintritt wie bei Benutzung von Extrakten aus syphilitischen Organen. Diese Beobachtung hat viele Autoren veranlaßt, an der Existenz von spezifischen Antikörpern des Syphiliserregers im Blute von Syphilitikern zu zweifeln, und es ist die Ansicht ausgesprochen worden, daß es Kolloidsubstanzen dieser Sera sind, welche mit andern kolloidalen oder lipoiden Substanzen oder Stoffen, die in den Organen enthalten sind, das Phänomen der Komplementbindung auslösen (Landsteiner und Stankowiz). Jedenfalls muß diese Frage noch als eine offene betrachtet werden, und man ist vorläufig gezwungen, sich über den Ursprung und die Entstehung der komplementverankernden Stoffe im Blut und in den Organen von Syphilitikern mit hypothetischen Erklärungen zu begnügen.

Nach dieser kurzen literarischen Skizzierung gehen wir zu unseren eigenen Versuchen über, die wir auf Veranlassung



und unter Leitung des Herrn Prof. Kolle zur Klärung der Frage unternommen haben.

Wie bereits eingangs angeführt, haben einige Autoren einen positiven Ausfall der Reaktion nicht nur bei Verwendung von Extrakten aus syphilitischen Organen als Antigen bekommen, sondern auch bei Verwendung von Extrakten aus Organen ganz gesunder Tiere. Bei unseren Versuchen haben wir zunächst quantitative Untersuchungen über die Bindungskraft der verschiedenen Extrakte (wässrige und alkoholische) von Organen normaler Tiere und Menschen angestellt und die Ergebnisse verglichen mit den Resultaten der auf gleiche Weise hergestellten Extrakte aus der Leber verschiedener luetischer Föten. Die Extrakte wurden quantitativ genau ausgewertet. Die Extrakte aus normalen Organen wurden in der Weise zubereitet, daß 1 g dieser Organe mit 25 ccm 96-proz. Alkohol im Mörser verrieben wurde. Nach 2—3-stündigem Schütteln mittels Apparates kam das Material für 2—3 Stunden in den Brutraum bei 37° und verblieb dann etwa 12 Stunden bei Zimmertemperatur. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde hierauf durch einen Papierfilter filtriert und auf Eis zum Gebrauch aufbewahrt. Extrakt von syphilitischer Leber, die uns im Laboratorium im trocknen Zustande zur Verfügung stand, haben wir mit Verwendung einer doppelten Menge Alkohol bereitet (1 g Organ : 50 ccm Alkohol). Das weitere Verfahren gestaltete sich dabei ganz gleich, wie bei der Verarbeitung normaler Organe. Im Verlauf unserer Arbeiten haben wir uns überzeugt, daß das Belassen der Extrakte für 12—18 Stunden im Brutraum ohne vorheriges Schütteln ihre Wirksamkeit absolut nicht beeinträchtigt und daß Erwärmen auf 60° oder längeres Aufbewahren (12—18 Stunden) bei Bruttemperatur ebenfalls keinen schädigenden Einfluß auf sie ausübt.

Da die Technik bei allen Komplementbindungsversuchen von großer Bedeutung ist, und da die Methodik, sowie die Kautelen und Kontrollen, gerade bei diesen Versuchen eine große Rolle spielen, so sei hier darauf noch etwas ausführlicher eingegangen. Bei der Ausführung unserer Versuche haben wir gewöhnlich das Extrakt in fallenden Dosen verwendet (0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01). Durch Vorversuche hatten wir uns überzeugt, daß das Extrakt in der von uns benutzten

höchsten Dose von 0,2 weder das Meerschweinchenkomplement noch rote Hammelblutkörperchen schädigend beeinflusst: niemals haben wir dabei eine Behinderung der Hämolyse oder eine Auflösung der roten Blutkörperchen gesehen. Nach Verteilung des Extraktes in die einzelnen Versuchsröhrchen wurde die Nachfüllung mit NaCl-Lösung bis auf 1 ccm vorgenommen und hierauf das zu untersuchende Serum in Dosen von 0,1 ccm (1 ccm einer 10-proz. Lösung) zugesetzt. Vorausgeschickte Kontrollversuche hatten uns gezeigt, daß solche Serumdosen weder das Komplement noch die roten Blutkörperchen nachteilig beeinflussen. Nach Zusatz von je 1 ccm einer 5-proz. Lösung vorher austitrierten frischen Meerschweinchenkomplementes wurden die Röhrchen für 1 Stunde bei 37° belassen und hierauf den einzelnen Röhrchen 2 ccm eines hämolytischen Systems zugefügt, bestehend aus einer 5-proz. Lösung gewaschener roter Hammelblutkörperchen und einem hämolytischen Ambozeptor in doppelter Titerdosis, der von einem gegenüber roten Blutkörperchen des Hammels immunisierten Kaninchen gewonnen war. Sämtliche Röhrchen verblieben zunächst 1 Stunde bei 37° und dann 15 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit wurde das Resultat abgelesen und notiert. Erwähnt sei noch, daß die zu den Versuchen benutzten Sera bei 56° während 1/2 Stunde inaktiviert worden waren.

#### Kaninchenalkoholextrakte.

	Herz	Leber	Niere	Milz	Gehirn	Uterus	Affen-Herz	Meersch.-Herz		Herz	Leber	Niere	Milz	Gehirn	Uterus	Affen-Herz	Meersch.-Herz
	Urethritis. Serum No. 5.									Lues II. Serum No. 6.							
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	+	×	×	0	0	0	0	×	×
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙	×
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙	⊕
	Lues II (?). Serum No. 7.									Lues II (?). Serum No. 8.							
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

× = starke Hemmung.  
+ = Hemmung.  
⊕ = etwas Hemmung.

⊙ = Spur von Hemmung.  
0 = vollkommene Hämolyse.

Meerschweinchenalkoholextrakte.

	Lues II (?) Serum No. 1				Lues II Serum No. 2				Ulcus glandis Serum No. 3				Lues III Serum No. 4			
	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz
Zu große Dose	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,5	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Affenalkoholextrakte.

	Lues II (?) Serum No. 1				Ulcus glandis Serum No. 3				Lues III Serum No. 4				Meersch.- Herz
	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	
0,2	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	×
0,1	○	○	○	○	○	○	○	○	+	+	○	○	×
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×

Hühneralkoholextrakte.

	Herz	Leber	Magen	Leb.-Lues- Extr. I	Leb.-Lues- Extr. II	Leb.-Lues- Extr. III	Meersch.- Herz I	Meersch.- Herz II	Rattenherz	Mensch. norm.-Leb. Extr.
Typhus verdächtig. Serum No. 9.										
0,2	○	○	○	×	○	○	○	○	○	·
0,1	○	○	○	×	○	○	○	○	○	·
0,05	○	○	○	×	○	○	○	○	○	·
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	·
Lues II. Serum No. 10.										
0,2	×	○	○	×	○	○	×	+	○	·
0,1	+	○	○	×	○	○	×	+	○	·
0,05	+	○	○	×	○	○	×	+	○	·
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	·
Lues maligna. Serum No. 11.										
0,2	×	×	×	×	○	○	×	×	×	○
0,1	×	×	×	×	○	○	×	×	×	○
0,05	×	×	×	×	○	○	×	×	×	○
0,02	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

Leberluesextrakte I, II, III und Normalleberextrakte 1,0 getrocknet  
+ 30 ccm 0,85 NaCl (Vollextrakte).

Meerschweinchenherzextrakt — ohne im Brutschrank stehen zu lassen.

## Rattenalkoholextrakte.

	Lues II (?) Serum No. 8					Lues II Serum No. 10					Lues maligna Serum No. 11								
	Herz	Leber	Niere	Meersch.- Herz I	Meersch.- Herz II	Herz	Leber	Niere	Milz	Gehirn	Meersch.- Herz I	Meersch.- Herz II	Herz	Leber	Niere	Milz	Gehirn	Meersch.- Herz I	Meersch.- Herz II
0,2	0	0	0	0	0	0	⊕	⊕	0	0	×	×	×	×	×	0	0	×	×
0,1	0	0	0	0	0	0	⊕	⊕	0	0	×	⊕	×	×	×	0	0	×	×
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	⊕	×	×	×	0	0	×	+

## Pferdealkoholextrakte.

	Herz	Leber	Niere	Milz	Vagus	Meersch.-Herz I	Meersch.-Herz II	Meersch.-Herz III	Meersch.-Herz 12 Std.	Meersch.-Herz 36 Std.	Herz	Leber	Niere	Milz	Vagus	Meersch.-Herz I	Meersch.-Herz II	Meersch.-Herz III	Meersch.-Herz 12 Std.	Meersch.-Herz 36 Std.
	Lues II. Serum No. 2.										Ulcer glandis. Serum No. 3.									
0,2	⊕	×	×	0	0	⊕	×	+	×	×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	⊕	0	0	0	0	⊕	+	0	+	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	⊕	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Typhus verdächtig. Serum No. 9.										Tabes dorsalis. Serum No. 13.									
	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lues? Serum No. 15.										Pellagra. Serum No. 14.									
	0,2	×	×	×	×	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	×	×	×	×	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,05	×	×	+	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	Ochs				Maus				Frosch			Meerschw.-Herz 12 Std.	Luesalkohol- extr. I
	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Muskel		
Lues II. Serum No. 16.													
0,2	×	×	×	0	×	×	0	0	⊙	×	×	×	×
0,1	0	0	⊙	0	×	0	0	0	0	0	0	×	×
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×
Paralysis progress. Serum No. 17.													
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralysis progress. Serum No. 18.													
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralysis progress. Serum No. 19.													
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralysis progress. Serum No. 20.													
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paralysis progress. Serum No. 21.													
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,1	×	×	×	0	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,05	×	×	×	0	×	×	×	0	×	×	×	×	×
Paralysis progress. Serum No. 22.													
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,1	×	×	×	0	×	×	×	0	×	×	×	×	×
0,05	×	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	×	×

## Menschliche und Katzenalkoholextrakte.

Menschliche Alkoholextrakte					Katzenalkoholextrakte							Luesalkoh.- extr. I	Meerschw.-Herz 24-stünd.
Herz	Leber	Niere	Milz	Kropf	Herz	Leber	Niere	Milz	Musculi	Lunge	Rücken- mark	Gehirn	

## Paralys. prog. Serum No. 23.

0,2	×	×	0	⊕	0	×	×	×	0	×	0	+	0	×
0,1	×	×	0	⊕	0	×	+	0	0	0	0	0	×	×
0,05	⊕	⊕	0	0	0	⊕	0	0	0	0	0	0	+	+
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0

## Paralys. prog. Serum No. 25.

0,2	×	×	0	0	⊕	×	×	×	+	×	0	+	+	×
0,1	×	⊕	0	0	⊕	⊕	+	0	0	0	0	0	0	×
0,05	⊕	⊕	0	0	0	⊕	0	0	0	0	0	0	0	×
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊕	+

## Psoriasis. Serum No. 29.

0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
0,1	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## Hamsteralkoholextrakte.

	Lues II. Ser. No. 30			Paral. prog. Ser. No. 19			Lues II. Serum No. 30				Paralys. prog. Serum No. 19			
	Herz	Leber	Niere	Herz	Leber	Niere	Luesalk.- Extr. I	Luesalk.- Extr. IV	Meerschw.- Herz alt	Meerschw.- Herz ge- wärmt bei 60°	Luesalk.- Extr. I	Luesalk.- Extr. IV	Meerschw.- Herz alt	Meerschw.- Herz ge- wärmt bei 60°
0,2	0	0	0	0	0	0	×	×	0	0	×	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0

Luetische Blutextrakte.

	Blutextr. No. 21	Blutextr. No. 22	Luesalk.-Extr. I	Norm. Leb.-Extr.	Meersch.-Herz 12-stünd.	Blutextr. No. 21	Blutextr. No. 22	Luesalk.-Extr. I	Norm. Leb.-Extr.	Meersch.-Herz 12-stünd.	Blutextr. No. 21	Blutextr. No. 22	Luesalk.-Extr. I	Norm. Leb.-Extr.	Meersch.-Herz 12-stünd.
	Paralys. progr. Serum No. 23					Paralys. progr. Serum No. 24					Paralys. progr. Serum No. 25				
0,2	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,1	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,05	0	0	×	+	×	0	0	×	+	×	0	0	×	+	×
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Paralys. progr. Serum No. 26					Paralys. progr. Serum No. 27					Paralys. progr. Serum No. 28				
0,2	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	+	+	+
0,1	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	+	+	+
0,05	0	0	×	+	×	0	0	×	+	×	0	0	+	+	+
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Luetische Extrakte.

	Psoriasis Serum No. 29 (normal)					Paralys. progr. Serum No. 26					Paralys. progr. Serum No. 27				
	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Meersch.-Herz 36std.	Rattenblutextrakt	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.
0,2	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,1	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,05	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Meersch.-Herz 36std.	Rattenblutextrakt	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.	Luesalkoh.-Extr. I	Luesalkoh.-Extr. II	Luesalkoh.-Extr. III	Luesalkoh.-Extr. IV	Norm.mensch. Leberextr.
0,2	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,1	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,05	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×	0	0	×	×	×
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die in der angegebenen Weise angestellten Versuche haben uns gezeigt, daß die Alkoholextrakte aus syphilitischer Leber im Vergleich zu Extrakten aus normalen Organen bei

weitem die stärkste Komplementbindung mit Syphilisserum ergeben. Von normalen Organen haben sich Herz und Leber als die wirksamsten Extrakte erwiesen; Milz und Niere sind weniger wirksam, während Nervensubstanz, Gehirn und Blutextrakte absolut negative Resultate liefern.

Bei manchen Tieren geben die Leberextrakte die besten Resultate (Kaninchen), bei anderen die Nierenextrakte (Katze).

Als das weitaus wirksamste Extrakt, das von normalen Tierorganen gewonnen werden kann, muß das Meerschweinchenherz bezeichnet werden, das in allen unseren Versuchen gegenüber sicher syphilitischen Sera positive Resultate ergab, allerdings stets in geringerem Grade, als Extrakte aus syphilitischer Leber. Es muß jedoch betont werden, daß nicht alle Meerschweinchenherzen die gleiche Wirksamkeit zeigen, was wohl auf einen verschiedenen Gehalt an den charakteristischen Stoffen beruht, welcher seinerseits nach gewissen, nicht aufgeklärten, individuellen Verschiedenheiten wechseln kann. Im Hinblick auf diese Tatsache ist es zur Herstellung eines konstanten Extraktes notwendig, dasselbe aus mehreren Meerschweinchenherzen zu bereiten, wodurch selbstverständlich Schwankungen durch individuelle Verschiedenheiten auf ein Minimum reduziert werden.

Aus diesen Versuchen geht nun mit Sicherheit hervor, daß die Komplementverankerung, welche das Serum syphilitischer Menschen entfaltet, wenn es mit bestimmten, aus syphilitischen und normalen Organen extrahierten Stoffen zusammengebracht wird, nicht spezifisch im Sinne der Serumwirkungen sein kann, wie wir sie bei bakteriellen Antisera beobachten. Wir haben es vielmehr mit einer für Syphilis charakteristischen Reaktion zu tun. Diese Komplementbindung ist bisher nur im Serum von Syphilitikern gefunden. Die aus den Organen extrahierten Stoffe können aber auch keine Antigene im Sinne der bakteriellen Antigene oder der in pflanzlichen und tierischen Zellen enthaltenen Antigene sein. Denn auch diese letzteren sind durchaus spezifisch, während die an Syphilisserum verankerten Stoffe sowohl in Organen syphilitischer Föten, wie auch in denjenigen normaler Menschen und Tiere vorkommen, allerdings in quantitativ abgestuften Mengen. Es handelt sich höchst wahrscheinlich um



lipoide oder diesen ähnliche Körper. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß die erwähnten Stoffe aus normalen und syphilitischen Organen mit Alkohol und Wasser extrahierbar sind. Die auf Grund physiologisch-chemischer Untersuchungen lipoidreichsten Organe geben auch die größte Ausbeute an den hier in Frage kommenden Stoffen.

Zur Kontrolle und zum Vergleich der mitgeteilten Versuche haben wir ferner alkoholische Extrakte verschiedener Bakterienarten, die in gleicher Weise wie die Organextrakte zubereitet wurden, mit Hilfe der Wassermannschen Reaktion als Antigene ausgeprüft. Wie die Tabellen zeigen, hat kein einziges dieser Extrakte gegenüber syphilitischen Sera irgend eine Andeutung einer Reaktion gezeigt; nur die Extrakte von Choleravibrionen, Dysenteriebakterien und Tuberkelbacillen ergaben in hohen Dosen Hemmung der Hämolyse. Die Ursache dieser Erscheinung konnte jedoch von uns nicht aufgedeckt werden. Wir können nur auf eine Reihe von Versuchen hinweisen, wo fast sämtliche Extrakte aus den verschiedensten Bakterienarten gegenüber einem Serum, das von einem, mit chronischem Ulcus cruris behafteten Patienten stammte, ausgesprochen positive Resultate ergaben, und zwar meistens bis zu einem Titer von 0,05 Extrakt, ja mitunter noch höher.

Lecithin hat sich bei unseren Komplementbindungsversuchen als nicht geeignet zur Ausführung der Reaktion erwiesen, da es, in großen Dosen angewendet, störende Trübungen hervorruft und bei kleinen Dosen negative Ergebnisse liefert. Mastix ist mit Bezug auf die Eigenschaft, Trübungen zu erzeugen, noch weniger verwendbar, obwohl es hie und da gegenüber syphilitischen Sera positive, wenn auch nicht konstante Resultate gibt: manchmal sieht man bei Anwendung großer Dosen einen negativen Ausfall der Reaktion und umgekehrt bei kleinen Dosen einen positiven Ausgang. Alkoholische Extrakte, hergestellt aus Pflanzen, zeigen gegenüber normalen und syphilitischen Sera keine Spur von Komplementverankerung. Extrakte von Carcinomen und Strumen eignen sich ebenfalls nicht als Antigene, weil sie, wie die Bakterienextrakte, ein positives Resultat nur ausnahmsweise und zwar bei Anwendung großer Dosen zeigen.

## Bakterien- und Pflanzenalkoholextrakte.

	Carc. mamm.	Cholera	Diphtherie	Dysenterie	Meningocc.	Paratyphus	Typhus	Staphyloc.	Streptococc.	Lecithin	Mastix	Kohlenextr.	Tannenextr.	Luesalk.- Extr. I	Luesalk.- Extr. IV	Meerschwein- chenherz
Serum No. 24. Paralys. progr.																
0,2	×	0	0	0	0	0	0	0	0	⊕	×	×	×			
0,1	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	+	×	×	×			
0,05	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	0			
Serum No. 69. Lues II.																
0,2	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	×
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	⊕
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	⊕
0,02														×	0	0
Serum No. 59. Ulcus cruris.																
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	⊕	×	×	×	×	×	0
0,1	+	+	+	+	×	×	×	+	⊕	×	×	×	+	×	×	0
0,05												0	0	×	×	0
0,02														0	0	0

1) Lecithin und Mastix zu trüb.

## Bakterien- und Pflanzenalkoholextrakte.

	Carc. mamm.	Cholera	Diphtherie	Dysenterie	Meningocc.	Paratyphus	Pneumocc.	Tuberculosis	Typhus	Staphyloc.	Streptococc.	Lecithin	Mastix	Kohlenextr.	Tannenextr.	Luesalk.- Extr. I	Luesalk.- Extr. IV	Meerschw.- Herz
Serum No. 30. Lues II.																		
0,2	×	×	0	×	0	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0	×	×	×
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊕	0	0	×	×	×
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	⊕	0	0	×	×	0
Serum No. 18. Paralys. progr.																		
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Serum No. 6 + 24 + 69. Gemisch luetischer Sera.																		
0,2	+	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	+
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	+	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Serum No. 70. Ulcus cruris.																		
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	×	×	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nachdem wir im ersten Teil unserer Versuche über die Natur der komplementverankernden Stoffe, welche das Analogon der Antigene sind, mitgeteilt haben, wenden wir uns dem Studium der Antikörper zu.

Schon im ersten Teil unserer Versuche hatten wir uns überzeugt, daß unsere Extrakte, namentlich das aus syphilitischer Leber bereitete, gegenüber einem austitrierten wirksamen syphilitischen Serum bis zu Dosen von 0,01 stets ein positives Resultat ergaben, während gegenüber normalen Seris der Ausgang der Reaktion immer ein negativer war. Erwähnt sei an dieser Stelle, daß eines der uns zur Verfügung stehenden Extrakte syphilitischen Ursprunges hie und da auch gegenüber Normalseris positiv reagierte. Dieses Extrakt war jedoch in nicht ganz trockenem Zustand aufbewahrt worden, und es fanden wohl infolge Bakterienentwicklung gewisse Veränderungen darin statt, die sein differentes Verhalten bedingten, weshalb wir diesen Versuchen keine Bedeutung beilegen.

In weiteren Versuchen haben wir das Verhalten einer Reihe von Immunsera, die von verschiedenen, mit Bakterien und Giften vorbehandelten Pferden stammten, gegenüber syphilitischen Extrakten einer Prüfung unterzogen. Diese Versuche haben gezeigt, daß längere Zeit gelagerte, von Pferden gewonnene Immunsera gegenüber allen unseren syphilitischen Extrakten, mit Ausnahme des oben erwähnten Extraktes, keine Komplementbindung erkennen ließen, während ganz frische Immunsera nur mit hohen Dosen von syphilitischen und normalen Leberextrakten einen positiven Verlauf der Reaktion zeigten. Streptokokken- und teilweise auch Meningokokken- und Diphtherieserum gaben mitunter Komplementbindung selbst bei Verwendung kleinerer Dosen des Syphilisextraktes. Frische normale Tiersera (Kaninchen, Pferd) wiesen gegenüber hohen Dosen syphilitischer Extrakte ein nicht konstantes Bindungsvermögen auf. Extrakte aus normalen Herzen verhielten sich gegenüber den verschiedenen Immunseris ganz negativ. Im allgemeinen haben wir bemerkt, daß frische Sera ein stärkeres komplementverankerndes Vermögen besitzen als alte Sera.

Um weitere Aufschlüsse über die Natur der in den Extrakten enthaltenen Komplementverankernden Stoffe zu erhalten, haben wir die alkoholischen Extrakte zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Das Serum dieser Kaninchen wurde dann zu Komplementbindungsversuchen, zusammen mit den Alkoholextrakten, benutzt. Die Kaninchen wurden mittels wiederholter (3mal in Zwischenräumen von je 1 Woche und in jeweiliger Dosis von 1 ccm) intravenöser Injektionen von Extrakten aus syphilitischer Leber und aus normalen Organen — Menschenleber, Meerschweinchen- und Ochsenherz — zu immunisieren versucht. Der Alkohol der Extrakte wurde vor ihrer Verwendung im Brutschrank zum Verdunsten gebracht. Nach der zweiten Einspritzung wurde zur Probe eine kleine Menge Blut entnommen und im Komplementbindungsversuch gegenüber denjenigen Substanzen, mittels welcher die Tiere behandelt waren, geprüft. Am Schlusse der Immunisation erfolgte die totale Entblutung der Tiere. Aus ihren Organen wurden alkoholische Extrakte hergestellt. Die Untersuchung bezog sich auf die Auswertung der gewonnenen Sera gegenüber den zur Immunisierung verwendeten Stoffen und auf die Prüfung der von diesen Tieren bereiteten Organextrakte in ihrem Verhalten gegenüber syphilitischen Sera. Als Kontrolle dienten Versuche mit Normal-Menschen und -Kaninchenseris.

## Immunsera.

	Typhus-Serum					Diphtherie-Serum					Streptokokk.-Serum					Pest-Serum					Meningok.-Serum				
	Lucsalk.-Extr. I	Meersch.-Herz 24std.	Meersch.-Herz 36std.	Menschen-Herz	Ochsen-Herz	Lucsalk.-Extr. I	Meersch.-Herz 24std.	Meersch.-Herz 36std.	Menschen-Herz	Ochsen-Herz	Lucsalk.-Extr. I	Meersch.-Herz 24std.	Meersch.-Herz 36std.	Menschen-Herz	Ochsen-Herz	Lucsalk.-Extr. I	Meersch.-Herz 24std.	Meersch.-Herz 36std.	Menschen-Herz	Ochsen-Herz	Lucsalk.-Extr. I	Meersch.-Herz 24std.	Meersch.-Herz 36std.	Menschen-Herz	Ochsen-Herz
0,2	×	0	0	0	0	×	0	0	0	0	×	0	0	0	0	×	0	0	0	0	×	0	0	0	0
0,1	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Immunsera gegen wichtigsteluetische Extrakte.

	Lucasalk.-Extr. I	Lucasalk.-Extr. II	Lucasalk.-Extr. III	Lucasalk.-Extr. IV	Norm.mensch. Leb.	Meerschw.-Herz	Ochsenherz	Pferdeherz	Lucasalk.-Extr. I	Lucasalk.-Extr. II	Lucasalk.-Extr. III	Lucasalk.-Extr. IV	Norm.mensch. Leb.	Meerschw.-Herz	Ochsenherz	Pferdeherz	Lucasalk.-Extr. I	Lucasalk.-Extr. II	Lucasalk.-Extr. III	Lucasalk.-Extr. IV	Norm.mensch. Leb.	Meerschw.-Herz	Ochsenherz	Pferdeherz
	Streptokokken-Serum								Dysenterie-Serum								Pneumokokken-Serum							
0,2	×	+	+	×	×	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0
0,1	⊕	⊙	⊙	⊕	⊕	0	0	0	⊙	0	0	0	0	0	0	0	⊕	0	0	0	0	0	0	0
0,05	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetanus-Serum								Pferde-Normalserum (trock.)								Rinder-Normalserum (trock.)							
0,2	×	0	0	0	0	0	0	0	×	⊕	⊕	+	⊕	0	0	+	×	0	0	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0	0	0	⊙	⊕	⊕	0	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Meerschw.-Normalserum								Kaninchen-Normalserum								Typhus-Serum							
0,2	×	⊙	⊙	⊕	0	0	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	⊙	0	0	0	0
0,1	⊕	0	0	0	0	0	0	0	⊙	0	0	0	0	0	0	0	⊕	0	0	0	0	0	0	0
0,05	⊙	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Paratyphus-Serum								Cholera-Serum								Diphtherie-Serum							
0,2	×	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	0	0	0	0	0
0,1	+	0	0	0	0	0	0	0	⊙	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pest-Serum								Meningokokken-Serum								Menschen-Normalserum No. 29							
0,2	×	0	0	0	0	0	0	0	×	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	⊕	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
									Menschl.-luetisch. Serum No. 24															
0,2									×	×	×	×	×	×	×	×								
0,1									×	×	×	×	×	×	×	×								
0,05									×	×	×	×	×	×	×	×								
0,02									+	+	+	+	+	+	+	+								

## Kaninchen- und Pferdenormalserum.

	Kaninchen- Normalserum	Pferde- Normalserum	Lues II Serum No. 16	Paralys. prog. Serum No. 21	Paralys. prog. Serum No. 24
	Luesalkoh.-Extr. I Meersch.-Herz 24std. Normalleberextr. Milzextr. Ochs	Luesalkoh.-Extr. I Meersch.-Herz 24std. Normalleberextr. Milzextr. Ochs	Luesalkoh.-Extr. I Meersch.-Herz 24std. Normalleberextr. Milzextr. Ochs	Luesalkoh.-Extr. I Meersch.-Herz 24std. Normalleberextr. Milzextr. Ochs	Luesalkoh.-Extr. I Meersch.-Herz 24std. Normalleberextr. Milzextr. Ochs
0,2	×	×	×	×	×
0,1	○	○	+	×	×
0,05	○	○	○	×	×

## Frische Pferdeimmunsera gegen wichtigste Extrakte.

	Luesalkoh.-Extr. I Luesalkoh.-Extr. II Luesalkoh.-Extr. IV Leber norm. (mensch.) Meersch.-Herz Meersch.-Herz gewärmt Ochsenherz Pferdeherz	Luesalkoh.-Extr. I Luesalkoh.-Extr. II Luesalkoh.-Extr. IV Leber norm. (mensch.) Meersch.-Herz Meersch.-Herz gewärmt Ochsenherz Pferdeherz	Luesalkoh.-Extr. I Luesalkoh.-Extr. II Luesalkoh.-Extr. IV Leber norm. (mensch.) Meersch.-Herz Meersch.-Herz gewärmt Ochsenherz Pferdeherz
	S. No. 60 Diphtherie-Serum.	S. No. 61 Meningokokk.-Serum.	S. No. 64 Normalserum Pferd.
0,2	×	×	×
0,1	×	×	×
0,05	×	×	×
	Serum No. 62 Streptokokken-Serum.	S. No. 63 Typhus-Serum.	
0,2	×	×	
0,1	×	×	
0,05	×	×	

Normalmenschensera gegen die wichtigsten Extrakte.

	Luesalk.-Extr. I	Luesalk.-Extr. II	Luesalk.-Extr. III	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meersch.-Herzextr.
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Serum No. 46.					
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Serum No. 47.					
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Serum No. 48.					
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Serum No. 49.					
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Serum No. 50.					
0,2	×	0	0	0	0	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
	Lues verdächtig. Serum No. 51.					
0,2	×	⊙	⊙	+	+	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	+	0	0	0	0	0
	Lues III. Serum No. 52.					
0,2	×	×	×	×	×	×
0,1	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
0,05	+	0	0	0	0	0
	Lues verdächtig. Serum No. 53.					
0,2	×	⊙	+	×	⊙	0
0,1	⊙	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0

Erste Immunisation.

Kaninchenimmunsersa gegen entsprechende Extrakte.

	Serum No. 54 Kaninchen- serum mit Alkoh.lues- Extr. IV immunisiert	Serum No. 55 Kaninchen- serum mit Leber normal Mensch immunisiert	Serum No. 56 Kaninchen- serum mit Meer- schweinchen- herzalkoh.- Extrakt immunisiert	Serum No. 57 Kaninchen- serum mit Ochsenherz- alkoh.-Extr. immunisiert	Serum No. 58 Kaninchen- serum normal
	Luesalk.-Extr. IV	Luesalk.-Extr. IV.	Luesalk.-Extr. IV	Luesalk.-Extr. IV	Luesalk.-Extr. IV
	Leber norm. (Mensch)	Leber norm. (Mensch)	Leber norm. (Mensch)	Leber norm. (Mensch)	Leber norm. (Mensch)
	Meerschweinchenherz	Meerschweinchenherz	Meerschweinchenherz	Meerschweinchenherz	Meerschweinchenherz
	Ochsenherz	Ochsenherz	Ochsenherz	Ochsenherz	Ochsenherz
0,2	×	×	×	×	×
0,1	×	×	×	×	×
0,05	×	×	×	×	×
0,02	+	+	+	+	+
0,010	0	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0	0

## Zweite Immunisation.

## Kaninchenimmunsera gegen entsprechende Extrakte.

	S. No. 54 Kaninchen- serum mit Luesalk.- Extr. IV immun.				S. No. 55 Kaninchen- serum mit Leb. normal immun.				S. No. 56 Kaninchen- serum mit Meerschwein- chenherz immun.				S. No. 57 Kaninchen- serum mit Ochsenherz immun.				S. No. 58 Kaninchen- serum normal			
	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meerschweinchenherz	Ochsenherz	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meerschweinchenherz	Ochsenherz	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meerschweinchenherz	Ochsenherz	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meerschweinchenherz	Ochsenherz	Luesalk.-Extr. IV	Leber norm. (Mensch)	Meerschweinchenherz	Ochsenherz
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,1	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,01	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,005	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

## Dritte Immunisation.

## Immunkaninchensera gegen entsprechende Kaninchen-alkoholextrakte.

	Luesalk.-Extr. IV	Meersch.-Herz	Leber norm. (Mensch)	Ochsenherz	Kaninchen-alk.-Extr.				Kaninchen-alk.-Extr.				Kanin.-normal alk.-Extr.			
					Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	
0,2	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Serum No. 54 Kaninchen mit Luesalk.-Extr. IV immunisiert
0,1	+	+	+	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,2	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Serum No. 56 Kaninchen mit Meersch.-Herz Alk.-Extr. imm.
0,1	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,2	×	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Serum No. 58 Kaninchen normal
0,1	+	+	+	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	



Immunkaninchenalkoholextrakte gegen menschliche Sera.

	Luesalk.-Extr. IV	Meerschweinchenherz	Leber norm. (Mensch.)	Ochsenherz	Extr. von Kan. mit Luesalk.-Extr. IV immun.				Extr. von Kan. mit Meerschw.-Herz immun.				Extr. von Kan. normal			
					Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	
0,2	×	×	×	×	×	×	×	0	×	×	×	0	×	×	×	No. 67 Menschliches luetisches Serum
0,1	×	×	×	×	+	+	+	0	×	×	×	0	×	×	×	
0,06	×	×	×	×	+	+	+	0	×	×	×	0	×	×	×	
0,02	⊕	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	
0,2	×	0	×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	No. 68 Menschliches Normalserum
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Dritte Immunisation.

	Extrakt von Kaninchen mit Normalleber immunisiert				Extrakt von Kaninchen mit Ochsenherz immunisiert				
	Herz	Leber	Niere	Milz	Herz	Leber	Niere	Milz	
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	No. 55 Kaninchenserum mit Normalleber immun.
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	No. 57 Kaninchenserum mit Ochsenherz immun.
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	No. 58 Normalkaninchen- serum
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	

Diese Versuche haben gezeigt, daß im Blute von Tieren, die mit normalen und syphilitischen Organextrakten behandelt sind, keine komplementverankernden Stoffe gebildet werden.

Hieraus ergibt sich die schon durch anderweitige Beobachtungen gestützte wichtige Tatsache, daß die mit Alkohol

extrahierten Stoffe keine Antigene im Sinne der Bakterienantigene sind. Denn zum Begriff eines Antigens gehört die Eigenschaft, daß sich Antikörper mit ihm erzeugen lassen. Das ist aber hier nicht gelungen. Durch diese Versuche wird es aber auch unwahrscheinlich gemacht, daß die komplementverankernden Stoffe des Serums syphilitischer Menschen Antikörper im Sinne jener spezifischen Substanzen sind, wie sie im Serum der mit Bakterien vorbehandelten Tiere auftreten.

Zum Schluß sei auf die praktische Bedeutung der Komplementverankerungsmethode bei Syphilis und auf die bei der Ausführung der Probe zu beachtenden Kautelen und technischen Details mit einigen Worten hingewiesen. Auf Grund von mehr als 200 Untersuchungen, die hier nicht im einzelnen aufgeführt sind, weil sie zu rein diagnostischen Zwecken unternommen wurden, können wir der Ueberzeugung Ausdruck geben, daß der Wassermann-Neisser-Bruckschen Reaktion bei sachgemäßer, genauester Ausführung unzweifelhaft eine praktische Bedeutung bei der Diagnose der Syphilis zugesprochen werden muß. Die Reaktion kann nicht in dem Sinne spezifisch genannt werden, daß mit ihrer Hilfe spezifische, durch den spezifischen Erreger hervorgerufene Antikörper nachgewiesen werden. Ihr positiver Ausfall weist jedoch mit Sicherheit darauf hin, daß der Organismus entweder syphilitisch erkrankt ist oder eine Syphilis überstanden hat. Ist also diese Reaktion nicht im gewohnten Sinne als spezifisch zu bezeichnen, so ist sie doch für die syphilitische Erkrankung charakteristisch: es sind, nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse wahrscheinlich Produkte des pathologisch veränderten menschlichen Stoffwechsels, die unter dem Einfluß der Erkrankung in vermehrter Weise in den Organen angehäuft werden und für welche im Blute von Syphilitikern entsprechende bindende Gruppen vorhanden sind. Nach unserer Ansicht gebührt der Wassermannschen Reaktion innerhalb unserer syphilidologisch-diagnostischen Hilfsmittel eine hervorragende Stelle, und sie ist berufen, namentlich jene Fälle aufzuklären, welche keine oder nicht ausreichende klinische Symptome zeigen oder gezeigt haben.

Was die Technik bei Ausführung der Reaktion im allgemeinen anbetrifft, so müssen wir auf Grund unserer zahlreichen und oft wiederholten Versuche die Forderung aufstellen, daß die Prüfung der verdächtigen Sera mit wenigstens zwei erprobten Extrakten: Extrakt einer syphilitischen Leber und Extrakt von Meerschweinchenherz — bei gleichzeitiger Kontrolle mit Hilfe eines syphilitischen Serums von bekanntem Titer und eines Normal-Menschen-serums — geschehen muß; man wird so die Irrtümer in der Diagnose leichter vermeiden und Fehler der Technik möglichst reduzieren. Eine Kontrolle der Extrakte ist hingegen, wenn man im Besitze eines gut wirksamen Präparates sich befindet, nicht bei jeder Versuchsanordnung notwendig; es genügt, wenn man die Extrakte 2- oder 3mal im Monat gegenüber syphilitischen Seris und Normal-seris auswertet.

Bezüglich der Versuchsanordnung sei bemerkt, daß es sich empfiehlt, bei Anstellung des Versuches das Serum in konstanten Dosen und das Extrakt in fallenden zu benutzen. Hat man genügend Serum zur Verfügung, so kann man zur Kontrolle eine Reihe einschieben, bei welcher das Extrakt als Konstante figuriert. (Syphilisextrakt 0,1; Meerschweinchenherzextrakt 0,2.) Diese Anordnung wird namentlich in jenen Fällen notwendig sein, die klinisch zweifelhaft sind. Große Dosen von Extrakt — mehr als 0,2 — hemmen die Hämolyse; diese Dosis ist in dieser Beziehung die Grenzdosis. Die kleinste Dosis Extrakt, die in seltenen Fällen noch positive Resultate gibt, ist 0,01. Die schädigende Einwirkung des Alkohols auf das Komplement bei Verwendung alkoholischer Extrakte wird dadurch möglichst ausgeschaltet, daß man bei der Versuchsanstellung zunächst die Extrakte in die Röhrchen abfüllt, hierauf Serum in 10-proz. Lösung zufügt und erst am Schlusse das Komplement — 1 ccm einer 5-proz. Lösung — beigibt. Dadurch wird erreicht, daß das Komplement in eine stark verdünnte, etwa 7-proz. alkoholische Lösung hineingelangt, die keinen schädigenden Einfluß auszuüben vermag, während bei einer anderen Versuchsanordnung das Komplement anfangs in 25-proz. alkoholischer Lösung sich befinden kann, was entschieden nachteilig wirken muß.

Bei den Untersuchungen sollten stets die gewöhnlichen 7 Kontrollröhrchen angelegt werden.

Wird die Untersuchung von Exsudaten oder von Cerebrospinalflüssigkeiten ausgeführt, so sollten diese Stoffe nach unserer Ansicht in konstanten Dosen von 0,2 verwendet werden, bei fallenden Dosen des Extraktes. Man kann aber auch das Extrakt in konstanten Verhältnissen benutzen (0,1 Extrakt von syphilitischer Leber und 0,2 Meerschweinchenherzextrakt) und das zu prüfende Substrat in fallenden Dosen.

#### Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse.

1) Die W.-N.-B. Reaktion ist für die Diagnose der Syphilis ein sehr wichtiges Hilfsmittel. Das geht in Bestätigung der bisherigen Veröffentlichungen auch hervor aus der Untersuchung von 140 teils klinisch sehr luesverdächtigen Fällen, über die von einem von uns (Dr. M. Isabolinsky) in dem 3. Heft der Arbeiten aus dem Institut berichtet werden soll.

2) Der positive Ausfall der Reaktion zeigt mit Sicherheit, daß eine syphilitische Erkrankung bei dem betreffenden Individuum besteht oder bestanden hat. Wie die Untersuchungen des erwähnten, zu veröffentlichenden klinischen Materials beweisen, hat sich die Reaktion namentlich bei Knochen-, Leber- und Lungenaffektionen auf Syphilis verdächtigen Ursprunges, bei Gehirntumoren und bei Fällen, die Kinder von syphilitischen Eltern betrafen, als diagnostisches Hilfsmittel durchaus bewährt.

3) Die Reaktion kann als eine für Syphilis charakteristische, jedoch nicht im Sinne des Bindungsmodus bakterieller Sera und der zugehörigen Antigene spezifische bezeichnet werden. Als komplementverankernde Stoffe liegen der Reaktion bei Syphilis weder Antigene noch Antikörper zugrunde im Sinne bakterieller Antigene und Antikörper. Wenn es auch, wie unsere Versuche zeigen, in der Regel nicht gelingt, mit pflanzlichen Extrakten oder mit Extrakten aus tierischen Organen bei Mischung mit Serum Syphilitischer Komplementbindung in gleich starkem Maße wie mit Extrakten syphilitischer Organe hervorzurufen, so beweisen doch die

positiven Ergebnisse, die mit manchen tierischen Organextrakten, wie z. B. Meerschweinchenherz, erzielt werden, und der hie und da beobachtete, wenn auch nicht konstante positive Ausfall der Reaktion bei Benutzung gewisser pflanzlicher Extrakte, daß die Reaktion im strengen Sinne nicht spezifisch für syphilitische Extrakte genannt werden kann.

4) Mit dieser Tatsache steht auch im Einklang, daß die komplementverankernden Stoffe, welche in Extrakten aus syphilitischen Organen enthalten sind, dem Gehalte an Spirochäten nicht parallel gehen. Sie stammen eben offenbar nicht direkt von den Spirochäten, sondern von den veränderten Körpergeweben.

5) Von den Extrakten aus normalen Organen verschiedener Tiere zeigen nur alkoholische Extrakte von Meerschweinchenherz zwar ein schwächeres Bindungsvermögen, verglichen mit Extrakten aus syphilitischer Leber, sind aber trotzdem für diagnostische Untersuchungen brauchbar. Wir haben in dieser Richtung zahlreiche und öfters wiederholte Versuche angestellt und haben dabei folgende Abstufungen in der Wirksamkeit der einzelnen Organe verschiedener Tierarten gefunden: Fast gleichwertige Resultate wie Extrakte aus syphilitischer Leber geben die Extrakte aus Meerschweinchenherz. Extrakte aus Meerschweinchenleber zeigen eine geringere Wirksamkeit, während Niere und Milz am schwächsten wirken. Bei Kaninchen zeigen Leberextrakte eine bessere Wirkung, als Extrakte von Herz, Niere und Milz, immerhin ist ihre Wirkung unzweifelhaft eine viel geringere, als diejenige der Extrakte von Meerschweinchenherzen. Extrakte von Ochsenherz geben ebenfalls gute Resultate, jedoch nicht in gleichem Maße, wie Extrakte aus Meerschweinchenherzen. Bei Katzen zeigen sich die Nierenextrakte am wirksamsten. Von menschlichen normalen Organen erwiesen sich Leberextrakte als die wirksamsten.

6) Wässerige und alkoholische Extrakte, hergestellt aus den verschiedenen Bakterienreinkulturen, zeigen im Komplementbindungsversuch gegenüber normalen und syphilitischen Seris im allgemeinen keine Wirksamkeit.

7) Durch Vorbehandlung von Tieren mit alkoholischen Extrakten von Organen normaler Tiere

und mit alkoholischen Extrakten von syphilitischer Leber können im Blute dieser Tiere keine komplementverankernden Stoffe erzeugt werden. Hierdurch wird mit Sicherheit bewiesen, daß die komplementverankernden Stoffe im Serum von Syphilitikern keine Antikörper im Sinne derjenigen sind, welche auf Grund der Immunitätslehre und Ehrlichs Theorie bisher als solche bezeichnet wurden.

[Aus dem Untersuchungsamt der Stadt Berlin; Direktor: Geh. Rat Prof. Proskauer.]

### **Zur Kenntnis der Wassermannschen Reaktion.**

Von **E. Seligmann.**

Die theoretischen Grundlagen der Wassermannschen Reaktion auf Lues sind seit Bekanntgabe dieser neuen serodiagnostischen Methode<sup>1)</sup> erheblich erschüttert worden. Die ursprüngliche Anschauung, es handle sich um die Zusammenwirkung von Antigen und Antikörper, die zur Bindung von Komplement führe, ist von Wassermann selbst aufgegeben und auch sonst ziemlich allgemein verlassen worden. Es werden vielmehr, nach den neueren Anschauungen, wahrscheinlich in den im Luetiker Serum vorhandenen Stoffen nicht Immunitätserscheinungen (Antikörper im eigentlichen Sinne), sondern Symptome der eingetretenen Infektion nachgewiesen.

Drei Reihen von Untersuchungen sind es, die zu dieser Umwertung der Methode geführt haben: einmal der Nachweis, daß zur Absorption von Komplement die Verbindung Antigen-Ambozeptor nicht erforderlich ist (Landsteiner und Stan-  
konvić<sup>2)</sup>), daß es vielmehr kolloidale Reaktionen ohne sichtbare Niederschlagsbildung gibt, die in genau der gleichen Weise Komplement „binden“ wie Immunitätsreaktionen [Selig-

1) Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 19.

2) Centralbl. f. Bakt., I. Abt., 1906, Bd. 42.

mann<sup>1)</sup>]; zweitens die Beobachtung, daß die wirksamen Stoffe der Organextrakte alkohollöslich und nicht an denluetischen Organismus gebunden sind, vielmehr aus den verschiedensten normalen Organen extrahiert werden können [Porges und Meier<sup>2)</sup>, Landsteiner, Pötzl, Müller<sup>3)</sup>, Levaditi und Yamanonchi<sup>4)</sup>, L. Michaelis<sup>5)</sup> u. a.]. Auch die Wassermannsche Schule hat neuerdings durch Meier<sup>6)</sup> anerkannt, daß mit normalen Organextrakten die gleichen Resultate zu erzielen sind, wie mitluetischen.

Diese beiden Untersuchungsreihen haben, wie schon erwähnt, die theoretischen Anschauungen über das Wesen der Reaktion umgewertet, die praktische Bedeutung der Methode haben sie jedoch nicht herabgemindert.

Die dritte Untersuchungsreihe betrifft den Nachweis der gleichen, scheinbar luesspezifischen Stoffe im Serum nichtluetischer Individuen. Die positiven Befunde bei Dourine [Landsteiner, Müller und Pötzl<sup>7)</sup>], bei Framboesie [Blumenthal<sup>8)</sup>], bei Lepra [Eitner<sup>9)</sup>, Wechselmann und Meyer<sup>10)</sup>, Meier<sup>11)</sup>] und anderen exotischen Krankheiten kommen für unsere Breitengrade als Fehlerquellen kaum in Betracht. Wohl aber haben die Mitteilungen von Much und Eichelberg<sup>12)</sup> über positive Reaktionen an Scharlachkranken zu umfangreichen Nachprüfungen Anlaß geben müssen. Die Reihe der Untersucher mit negativem Resultate unterbrochen zuerst Klopstock und ich<sup>13)</sup>. Wir erhielten in einer ganzen Anzahl von Scharlachfällen positive Ergebnisse, die auf eine eigentümliche Veränderung des benutzten Organextraktes

- 1) Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 32.
- 2) Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 51.
- 3) Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 50.
- 4) Soc. biol., 1907, No. 38.
- 5) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 13.
- 6) Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 51.
- 7) Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 46.
- 8) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 12.
- 9) Wiener klin. Wochenschr., 1906, No. 51.
- 10) Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 31.
- 11) Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 51.
- 12) Med. Klinik, 1908, No. 18.
- 13) Berl. klin. Wochenschr., 1908, S. 1719.

zurückzuführen waren. Der bisher einwandfrei funktionierende Extrakt fing nämlich plötzlich an, mit allen Scharlachseris und einigen Normalseris positive Reaktionen zu geben. Dies Verhalten wurde für mich der Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen. Das auch bei unserem Extrakte noch deutliche verschiedene Verhalten normaler und scharlachinfizierter Sera ließ die Frage entstehen, ob es sich bei den positiven Scharlachreaktionen nicht doch um besondere Eigenschaften des Scharlachserums handelt, oder ob nur die Eigenheiten des Extraktes hierfür in Frage kämen.

Inzwischen sind weiterhin positive Befunde an Scharlachseris erhoben worden von Halberstädter, Müller und Reiche<sup>1)</sup> und von Bruck und L. Cohn<sup>2)</sup>, die fast die gleichen Versuche angestellt haben, wie wir selbst, aber zu etwas anderen Resultaten kommen.

#### I. Weitere Untersuchungen an Scharlachseris.

Um festzustellen, ob die Eigenschaften der Extrakte allein entscheidend sind für eine positive Reaktion der Scharlachsera, haben wir jedes einzelne Serum gegen 9 verschiedene Extrakte geprüft. Im einzelnen handelte es sich um:

- Extrakt I: alkoholischer Extrakt aus normalem Menschenherzen;  
" II: desgl. aus einem anderen Menschenherzen;  
" III: desgl.;  
" IV: alkoholischer Extrakt aus einem tertiär syphilitischen Herzen;  
" V: wässriger Extrakt aus dem gleichen tertiär syphilitischen Herzen;  
" VI: alkoholischer Extrakt aus Meerschweinchenherzen;  
" VII: alkoholischer Extrakt aus der Leber eines hereditär syphilitischen Foetus;  
" VIII: wässriger Extrakt aus der gleichen Leber;  
" XI: wässriger Extrakt aus einer anderen hereditärluetischen Foetusleber.

1) Berl. klin. Wochenschr., 1908, S. 2268.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1908, S. 1917.



Jeder Extrakt wurde mit 0,2 ccm Serum in Reaktion gebracht; die üblichen Kontrollen der doppelten Mengen lösten komplett.

+ = positive Reaktion; — = negative Reaktion.

	Serum		Extrakt								
	Alter des Patienten	Krankheits-tag	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
1.	12 Jahre	43.	—	—	—	+	—	+	+	—	—
2.	7 "	36.	+	—	+	+	—	+	+	+	—
3.	11 "	9.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4.	6 "	19.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5.	2 "	16.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
6.	13 "	21.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	33 "	17.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8.	11 "	12.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
9.	9 "	7.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
10.	24 "	21.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11.	16 "	23.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12.	10 "	17.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
13.	15 "	20.	—	—	—	+	—	—	+	—	—
14.	16 "	17.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15.	28 "	23.	—	—	+	+	—	—	+	—	+
16.	22 "	34.	—	—	—	—	—	—	—	+	—
17.	19 "	29.	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Im ganzen			1	0	2	4	0	2	9	2	1

Ein Serum eines 18-jährigen Scharlachkranken (26. Tag) ist in diese Liste nicht mitaufgenommen. Dies Serum reagierte mit sämtlichen geprüften Extrakten positiv. Luesanamnese und Status waren vollkommen negativ. Wir sind gleichwohl geneigt, auf Grund von Erfahrungen, die wir weiter unten mitteilen werden, dies Serum fürluetisch zu erklären. Deshalb ist es ausgeschaltet worden.

Es ergibt sich also: von 17 Scharlachseris haben 10 mit wenigstens einem der 9 geprüften Extrakte positiv reagiert. Davon haben reagiert:

mit je	1 Extrakt	6 Sera
"	2 Extrakten	1 Serum
"	3 "	1 "
"	4 "	1 "
"	6 "	1 "

Betrachtet man umgekehrt die Extrakte nach der Häufigkeit der Reaktion, so ergibt sich:

Extrakt	I	hat mit	17	Seris	1	positive	Reaktion	gegeben
"	II	"	"	"	0	"	"	"
"	III	"	"	"	2	"	"	"
"	IV	"	"	"	4	"	"	"
"	V	"	"	"	0	"	"	"
"	VI	"	"	"	2	"	"	"
"	VII	"	"	"	9	"	"	"
"	VIII	"	"	"	2	"	"	"
"	IX	"	"	"	1	"	"	"

Die Herstellungsweise der Extrakte erwies sich somit nicht von wesentlicher Bedeutung für den Ausfall der Reaktion; sowohl alkoholische wie wässerige, sowohlluetische wie normale Extrakte haben positiv reagiert. Auffallend häufig sind die positiven Reaktionen bei Extrakt IV (4) und VII (9).

Aus diesem Befunde läßt sich ableiten: Besondere Eigenschaften der Extrakte sind augenscheinlich von irgendwelchem Einfluß auf den Ausfall der Reaktion; eine besondere Eigenschaft der Scharlachsera scheint aber ebenfalls zu bestehen, denn die positiven Resultate verteilen sich durchaus nicht immer gleichmäßig auf die „bevorzugten“ Extrakte<sup>1)</sup>.

## II. Untersuchungen an anderen nichtluetischen Seris.

Eine Kontrollreihe wurde mit den Seris an anderen Erkrankungen Leidender in genau der gleichen Weise ausgeführt. Es wurden die gleichen Dosen sowohl der Extrakte wie der Sera angewandt (s. nebenstehende Tabelle).

Ein Serum eines 30-jährigen Mannes mit Intoxicatio plumbi mußte auch in dieser Reihe ausgeschaltet werden. Es reagierte gleichfalls mit sämtlichen Extrakten positiv, so daß wir es fürluetisch erklärten, obwohl auch hier weder Status noch Anamnese Anhaltspunkte für Lues gaben.

1) Bemerkenswert ist, daß der Extrakt I der gleiche Extrakt ist, über dessen auffälliges Verhalten Klopstock und ich berichtet hatten. Der Extrakt hat sich allem Anscheine nach weiter geändert, er hat in dieser Versuchsreihe nur 1mal mit Scharlachserum positiv reagiert, keinmal mit Normalseris (s. unten).

Serum von	Extrakt								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
1. Bantischer Krankheit	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. Phthisis pulmonum	—	—	—	+	—	—	+	+	+
3. Influenza	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. Polyarthrit	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. Angina	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. Carcinoma hepatis	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Angina	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. Myocarditis	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. Rheumatismus	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10. Phthisis pulmonum	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11. Altersschwäche	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12. Pneumonie	—	—	—	—	—	—	+	—	—
13. „	—	—	—	+	—	—	—	—	—
14. „	—	—	—	—	—	—	+	—	—
15. „	—	—	—	—	—	—	+	—	—
16. Erysipel	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17. Pneumonie	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Im ganzen :	0	0	0	2	0	0	4	1	1

Stellen wir dieselben Tabellen auf wie für die Scharlachsera, so ergibt sich: von 17 Krankenseris haben 5 mit wenigstens einem Extrakt reagiert, 12 waren negativ.

Von den positiven haben

mit je 1 Extrakt reagiert 4 Sera  
 „ 4 Extrakten „ 1 Serum.

Die Umkehrung der Tabelle mit Bezug auf die Extrakte ergibt:

I	0	positive	Reaktionen
II	0	„	„
III	0	„	„
IV	2	„	„
V	0	„	„
VI	0	„	„
VII	4	„	„
VIII	1	„	„
IX	1	„	„

Ein Vergleich der Resultate mit Scharlachseris und Normalseris zeigt, daß die Extrakte IV und VII sich in beiden Fällen durch besondere Häufigkeit der positiven Reaktionen auszeichnen; daß aber auch bei diesen Extrakten, ebenso wie bei den anderen reagierenden Extrakten die Scharlachsera weitaus häufiger zu positiven Ergebnissen führen.

Damit ist sichergestellt, daß nicht nur die Extrakte allein an diesem Ergebnis schuld sind, sondern daß auch noch eine besondere Eignung der Scharlachsera hinzukommen muß, um die relative Häufigkeit der positiven Resultate zu erklären.

Sehr auffällig erscheinen die positiven Resultate mit den anderen, nichtluetischen Seris, die ohne Zweifel geeignet sind, auch die praktische Sicherheit der Wassermannschen Reaktion anzutasten. Wir müssen sogar noch weiter gehen, als es in den Tabellen zum Ausdruck kommt, und auf Grund unserer Erfahrungen mit insgesamt 15 verschiedenen Extrakten an einer großen Reihe von Kranken- und Leichenmaterial erklären: wir besitzen zurzeit keinen Extrakt, der nicht zu irgendeiner Zeit, in irgendeiner Konzentration mit irgendeinem nichtluetischen Serum positiv reagiert hätte.

Wir brauchen wohl nicht hinzuzufügen, daß mehr als doppelt so große Mengen von Extrakt bzw. von Serum allein in diesen Fällen nicht gehemmt haben.

Damit ist eine Tatsache zur Diskussion gestellt, die in hohem Grade geeignet ist, die praktische Bedeutung der Reaktion in der bisher geübten Technik einzuschränken. Der wesentlichste Punkt der Frage scheint mir der, daß die Extrakte in ihren Eigenschaften inkonstant sind, sich ändern können.

Meier hat neuerdings in Wien folgendes ausgeführt<sup>1)</sup>: „Namentlich haben die Untersuchungen von Seligmann und Klopstock, aber auch einige früher von uns gemachte Erfahrungen gezeigt, daß ein Extrakt sich in der Weise ändern kann, daß er in einer Dosis, in welcher er früher nur mit den syphilitischen Seris Hemmung gegeben hatte, später auch mit nicht syphilitischen Seris hemmen kann. Es ergibt sich hieraus die Konsequenz, die wir schon gezogen haben, jedoch bei anderen Autoren vermissen, daß man bei Verwen-

1) Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 51.

dung alter Extrakte, sobald man auch mit nicht syphilitischen Seris Hemmung erhält, nunmehr mit der Dosis heruntergeht bis zu einer Grenze, wo man nur mitluetischen Seris diese Reaktion antrifft; es ist uns dies dann auch jedesmal gelungen. Als weitere Konsequenz ergibt sich aus dieser Veränderlichkeit des Extraktes die Forderung, daß man als Gebrauchsdosis die geringste Dosis wählt, welche noch in ihrer Wirksamkeit dem zum Vergleiche herangezogenen Standardextrakte entspricht.“

In diesen Ausführungen G. Meiers ist ein Punkt nicht berücksichtigt, und zwar der wesentlichste: wann hat sich der Extrakt geändert? — Klopstock und ich haben gezeigt, daß der betreffende Extrakt, ebenso wie unsere anderen Extrakte, durchaus nicht mit allen Normalseris positiv reagierte, daß er vielmehr nur in einem relativ kleinen Prozentsatz der Fälle die positive „unspezifische“ Reaktion ergab. Die Kontrolle des Extraktes mit einem Normalserum, an der Meier die Veränderung des Extraktes feststellt, ist deshalb in keiner Weise ausreichend. Wenn beispielsweise in unserer Tabelle II Extrakt VIII einmal unter 17 Fällen „unspezifisch“ reagiert, so ist die Wahrscheinlichkeit doch recht gering, gerade ein positives Kontrollserum zu erwischen. Der Extrakt kann daher schon verschiedentlich zu falschen Diagnosen Anlaß gegeben haben, ohne daß es in der Kontrolle mit Normalserum zum Ausdruck kommen mußte. Die weitere Konsequenz, die Meier bei anderen Autoren vermißt hat, habe ich längst auf Anregung von Herrn Prof. Sobernheim in meinen Versuchen gezogen; allerdings mit anderem Erfolge als Meier: es ist mir mitunter gelungen, durch Heruntergehen mit der Extraktdosis zu einer Grenze zu kommen, wo man nur mitluetischen Seris Hemmung erhält, in einer größeren Zahl von Fällen aber war mit dem Aufhören der „unspezifischen“ Reaktionen auch die Grenze für eine positive Luesreaktion erreicht. Die Eigenart der Extrakte wie der Gehalt der Luetikersera an wirksamen Stoffen scheinen in gleicher Weise von Einfluß auf den unteren Grenzwert der Extrakte zu sein. Wir haben selbst beobachtet, daß eine sehr geringe Extraktdosis mit

einem Luetikerserum noch reagierte, während sie mit einem anderen, auch sicherluetischen Serum erst in höheren Dosen eine Reaktion gab.

Es ist auch aus einem anderen Grunde nicht zweckmäßig, wie Meier will, die geringste wirksame Extraktdosis anzuwenden. Nach unseren Erfahrungen nehmen speziell wässrige Extrakte ziemlich regelmäßig an Wirksamkeit ab, so daß nach und nach immer größere Dosen zu positiven Reaktionen notwendig werden. Hat man aber von vornherein die geringste wirksame Menge eines solchen Extraktes als Gebrauchsdosis verwandt, so kommt man in kurzer Zeit in die Gefahr, mit unwirksamen Extraktmengen zu arbeiten.

In einer kleinen Reihe von Fällen gelingt es, wie schon Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht<sup>1)</sup> angeben, die „unspezifischen“ Reaktionen durch Verwendung sensibilisierter Blutkörperchen auszuschalten, deren Avidität dann groß genug ist, das Komplement aus seiner wohl nicht sehr festen, unspezifischen Umklammerung an sich zu reißen; in der Mehrzahl der Fälle genügt aber auch diese Modifikation nicht.

Es bleiben somit, trotz aller Vorsichtsmaßnahmen, nicht wenige nichtluetische Sera übrig, die unter nicht zu erkennenden Umständen ein positives Resultat vortäuschen können.

Wir haben deshalb für unsere praktischen Versuche eine Aenderung der Methodik der Wassermannschen Reaktion getroffen, die uns bisher recht gute Erfolge gezeitigt hat.

Wir verzichten vollständig auf die Kontrolle mit Normalseris, da wir sie aus den oben erörterten Gründen als eine wirkliche Kontrolle nicht anerkennen können. Dafür ziehen wir nicht einen, sondern eine ganze Reihe von Extrakten zur Prüfung heran, so viele, als uns die Menge des zur Verfügung stehenden Serums gestattet. Wir benutzen mit Vorliebe Extrakte möglichst verschiedener Herkunft, normale wieluetische, neben-

---

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr., 1906, Bd. 55.

einander, und zwar verwenden wir sie in Dosen, die etwas oberhalb der geringsten wirksamen Menge liegen. Die Extrakt-dosen werden alle 1—2 Tage an verschiedenen, sicher luetischen Seris kontrolliert, so daß für den eigentlichen diagnostischen Versuch auch die Kontrolle mit Luesserum fortfallen kann. Die Kontrollen mit den doppelten Extrakt- und Serummengen bleiben bestehen. Die Resultate mit dieser Methodik sind eindeutig: handelt es sich um ein luetisches Serum, so geben alle Extrakte mit diesem Serum positive Reaktion (vollständige Hemmung); haben wir es dagegen mit nicht luetischem Serum zu tun, so tritt entweder bei allen Extrakten vollständige Lösung ein (in der Mehrzahl der Fälle), oder der eine oder der andere Extrakt zeigt Hemmung, die sich dadurch als unspezifisch charakterisiert, daß sie nicht gleichmäßig bei allen Extrakten zum Ausdruck gekommen ist.

Fränkel und Much<sup>1)</sup> haben aus anderen Gründen vorgeschlagen, stets mehrere Extrakte zur Prüfung heranzuziehen. Sie fanden nämlich, daß manche Luetikersera mit dem einen Extrakt noch reagierten, während sie mit dem anderen keine Reaktion mehr gaben. Allem Anscheine nach haben die Autoren mit dem unteren Grenzwerte ihrer Extrakte gearbeitet, der, wie ich oben ausgeführt habe, für manche sicher luetische Sera nicht mehr ausreichend ist. Hier sind also ganz andere Gesichtspunkte maßgebend gewesen als bei meiner Versuchsanordnung.

Praktisch ergibt sich somit aus diesen Versuchsreihen, daß es mit der von uns modifizierten Methode auch weiterhin gelingen wird, sichere Luesdiagnosen zu stellen, trotzdem eine Reihe von Normalseris mit verschiedenen Extrakten positiv reagieren können. Theoretisch aber veranlassen uns die mitgeteilten Beobachtungen, bezüglich des Wesens der Wassermannschen Reaktion den Standpunkt einzunehmen, den Porges, Elias, Salomon und Neubauer<sup>2)</sup> für die Lecithinausflockung luetischer Sera entwickelt haben, und den

1) Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 48.

2) Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 21.

Much<sup>1)</sup> auf die Komplementbindungsreaktion übertragen hat: wir halten das der Reaktion zugrunde liegende Phänomen für eine kolloide Ausflockungsreaktion, die für Lues nur charakteristisch ist durch eine bestimmte Reaktionsbreite, sowohl der Sera wie der Extrakte. Und gerade der Umstand, daß die Reaktion sowohl beim Extrakt wie beim Serum eine bestimmte Konzentration erfordert, die zueinander in einem ganz bestimmten Verhältnis stehen müssen, macht es erklärlich, daß derartige „unspezifische“ Reaktionen mit Normalseris zustande kommen können, wie wir sie beschrieben haben.

#### Zusammenfassung.

1) Weitere Untersuchungen an Scharlachseris haben ergeben, daß für den Ausfall positiver Wassermannscher Reaktionen besondere Eigenschaften sowohl der Extrakte wie der Scharlachsera anzunehmen sind.

2) Untersuchungen an anderen, nicht syphilitischen Seris haben ergeben, daß wir keinen Extrakt besitzen, der nicht zu irgend einer Zeit, in irgend einer Konzentration mit irgend einem nichtluetischen Serum positiv reagiert hätte.

3) Die Modifikation, die wir infolgedessen für die praktische Verwertung der Wassermannschen Reaktion getroffen haben, besteht darin, daß wir jedes zur Untersuchung kommende Serum nicht mit einem Extrakte sondern mit einer Reihe von Extrakten prüfen und auf die Kontrolle mit Normalserum verzichten.

4) Die theoretische Schlußfolgerung, die wir aus unseren Versuchen ziehen, ist die, daß wir die zur Komplementbindung führende Reaktion für eine kolloide Ausflockungsreaktion halten, und nicht für eine Reaktion zwischen Antigen und Ambozeptor.

---

Für die Ueberlassung der Scharlachsera sowie der Normalsera bin ich Herrn Prof. Krönig, Direktor der 2. Inneren

---

1) Med. Klinik, 1908, No. 28/29.



Abteilung am städtischen Krankenhaus am Friedrichshain, sowie seinen Assistenten, Herren Dr. Klopstock und Dr. Traugott, zu Dank verpflichtet. Herrn Prosektor Dr. Pick und seinem Assistenten Herrn Dr. Blume vom pathologischen Institute des gleichen Krankenhauses verdanke ich Leichensera.

---

[Aus Statens Seruminstitut, Kopenhagen.]

**Vergleich der Hämolyse durch Natronlauge und Vibriolysin in verschiedenen isotonischen Medien.**

Von **Y. Teruuchi** (Tokyo).

Wenn man quantitative Bestimmungen der Hämolyse häufig anstellt, stößt man bekanntlich nicht selten auf große Abweichungen zwischen verschiedenen Messungen. Es zwingt sich dann die Frage auf, wie viele von diesen Abweichungen vielleicht von ganz kleinen Veränderungen der Medien abhängig sind, in welchen die Reaktionen stattfinden.

Einer Anregung von Herrn Direktor Dr. Th. Madsen zufolge habe ich die nachstehenden Versuche angestellt, um einige von diesen Fragen aufzuklären.

Für die Versuche wurden immer Pferdeblutkörperchen verwendet; diese wurden zuerst durch scharfe Zentrifugierung vom Serum befreit, zweimal mit dem 4-fachen Volumen von verschiedenen Salzlösungen ausgewaschen und dann im Verhältnis von 2 Vol. Blutkörperchen auf 98 Vol. der betreffenden Lösungen aufgeschwemmt.

Die verwendeten Hämolsine waren Natronlauge und Vibriolysin. Absteigende Mengen hiervon wurden in Reagenzgläschen abgemessen, mit den betreffenden Lösungen auf konstantes Volumen, 2 ccm, gebracht und dann 8 ccm 2-proz. Blutkörperchenaufschwemmung in kräftigem Strahl hinzugefügt. Nach gründlicher Schüttelung wurden die Röhrchen ins Wasserbad von 37° gestellt, nach 2 Stunden heraus-

genommen und im Keller (ca. 10°) ca. 18 Stunden aufbewahrt. Die Hämolyse wurde nach der im hiesigen Institut gebräuchlichen kolorimetrischen Methode gemessen und prozentisch ausgedrückt<sup>1)</sup>.

Die Versuchsreihen, welche in derselben Tabelle zusammengestellt sind, sind alle untereinander vergleichbar, indem sie unter ganz denselben Bedingungen mit derselben Blutaufschwemmung und gleichzeitig ausgeführt sind.

#### Einfluß der Konzentrationsunterschiede der Lösung.

Gewöhnlich benutzt man wohl für Aufschwemmung der Blutkörperchen eine 0,85-proz. bis 0,9-proz. NaCl-Lösung. Wenn man diese Flüssigkeit mit der üblichen absteigenden Menge von Hämolysin (hämolytische Bouillon, Alkalien etc.) versetzt, wird man — trotz Auffüllung mit NaCl-Lösung auf konstantes Volumen — doch nicht vermeiden können, daß die Salzkonzentration sich etwas ändert.

Es wurde die Hämolyse durch NaOH und Vibriolysin in Blutkörperchenaufschwemmungen in 3 verschiedenen NaCl-Konzentrationen, 0,7 proz., 0,9 proz. und 1,5 proz., und ferner in 3 verschiedenen Lösungen von  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{Aq}$ , 2,5 proz., 3,3 proz. und 4,0 proz. untersucht. Die Grenzen der Lösungskonzentration, innerhalb deren die Blutkörperchen sich gut absetzen ohne Hämolyse, waren: für NaCl-Lösung 0,7 Proz. bis 2 Proz. und für  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{Aq}$ -Lösung 2,5 Proz. bis 5 Proz.

Wenn man die großen Versuchsfehler in Betracht zieht, geht aus Tabelle I hervor, daß durch die erwähnten Unterschiede der Salzkonzentration kein unzweideutiger Unterschied in dem Hämolysegrad verursacht worden ist.

---

1) Weiteres über die Technik siehe: Madsen, Allgemeines über bakterielle Antigene Toxine, deren Antikörper antitoxische Eigenschaften aufweisen; Kraus-Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung.

Tabelle I.

Einfluß des Konzentrationsunterschiedes der Lösung auf die Hämolyse.  
8 ccm 2-proz. Blutkörperchenaufschwemmung } Gesamtflüssigkeit auf 10 ccm  
+ Lysinlösungen } aufgefüllt, 2 Stunden bei 37°

Zugefügte Lysinmenge ccm	NaCl-Lösung			Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10Aq-Lösung		
	0,7 %	0,9 %	1,5 %	2,5 %	3,3 %	4,0 %
0,1 n NaOH	Hämolyse in %			Hämolyse in %		
0,2	100	100	—	—	—	—
0,18	97	95	100	—	—	—
0,16	92	95	95	—	—	—
0,15	90	90	95	—	—	—
0,14	72	75	90	100	—	—
0,13	60	65	83	97	100	100
0,12	43	50	62	95	95	97
0,11	24	47	45	70	85	95
0,1	12	24	17	55	60	87
0,08	2	5	10	8	20	45
0,065	0	0	3	1	3	3
0,05	0	0	3	0	1	3
0	0	0	0	0	0	0
Vibriolysin	Hämolyse in %			Hämolyse in %		
1,0	100	100	95	—	—	—
0,9	97	95	92	—	—	—
0,8	95	95	80	100	100	100
0,65	90	85	70	95	95	95
0,5	85	70	55	90	80	90
0,4	60	53	45	75	75	80
0,33	42	40	30	58	55	55
0,25	27	35	25	52	40	40
0,12	5	4	5	15	12	20
0	0	0	0	0	0	0

### Die Hämolyse in isotonischen Lösungen verschiedener Salze.

Die isotonischen Lösungen wurden nach Koeppe<sup>1)</sup> dargestellt.

Die Vorversuche hatten gezeigt, daß viele Substanzen für die Blutkörperchenaufschwemmung entweder gar nicht oder schlecht geeignet waren. Unter den organischen Verbindungen, die untersucht wurden, zeigten Rohrzucker, Mannit und Asparagin jedesmal die spontane Agglutination der Blutkörperchen, wodurch ihre genaue Dosierung unmöglich wurde.

1) Koeppe, Physikalische Chemie in der Medizin, 1900.

Es ist bemerkenswert, daß man im hiesigen Institut früher Rohruckerlösung für Blutkörperchenaufschwemmung monatelang benutzen konnte ohne Agglutinationserscheinung, und daß dann auf einmal Agglutination zutage trat. Dagegen konnte man Milch- und Traubenzucker ohne Schwierigkeit zur Aufschwemmung verwenden.

Erst wurde die Hämolysen in Aufschwemmungen von Natron- und Kaliumsalzen derselben Säure verglichen.

Tabelle II.

Vergleich des Hämolysenunterschiedes in Kalium- und Natriumsalzlösungen.

8 ccm 2-proz. Blutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
Lysinmengen } 2 Stunden auf 37°

Zugesetzte Lysinmenge ccm	Aufschwemmungen in							
	1,3 % NaNO <sub>3</sub>	1,4 % KNO <sub>3</sub>	1,3 % NaBr	1,75 % KBr	0,9 % NaCl	1,1 % KCl	3,2 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10Aq	1,9 % K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,1 n NaOH	Hämolyse in %							
0,2	100	100	100	100	—	—	—	—
0,18	85	95	95	97	—	100	—	—
0,16	50	75	73	80	100	90	—	—
0,14	30	35	48	56	90	80	100	100
0,12	17	32	35	48	75	45	95	90
0,11	15	25	18	24	56	30	75	75
0,1	4	20	15	8	15	5	45	33
0,09	2	8	17	4	12	4	40	17
0,08	0	2	1	3	2	2	12	3
0,065	0	2	1	1	1	1	3	2
0	0	0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }	0,7		0,8		0,85		1	
Vibriolysin	Hämolyse in %							
0,14	80	75	85	95	—	—	—	—
0,12	60	60	60	84	100	100	—	—
0,1	55	45	50	70	95	90	—	100
0,08	43	35	30	50	80	75	100	90
0,065	34	30	24	45	70	60	80	85
0,05	20	18	12	30	40	42	70	70
0,04	15	10	5	20	36	30	40	45
0,033	7	8	4	18	20	25	36	35
0,025	4	4	3	8	12	12	20	15
0,02	3	2	3	5	10	10	10	10
0,016	2	2	—	3	3	5	2	2
0	0	0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }	0,5		0,5		0,8		1	

Betrachtet man alle Versuchsergebnisse untereinander, so geht hervor, daß die Hämolyse in den Natrium- und Kaliumreihen durchschnittlich dieselbe war.

Ferner sieht man, daß die Empfindlichkeit der Blutkörperchen von der Aufschwemmungsflüssigkeit sehr abhängig ist. Die höchste Empfindlichkeit findet sich in den Sulfaten, dann absteigend in Chloriden, Bromiden und Nitraten. Die Reihenfolge war dieselbe für NaOH und Vibriolysin. Am Ende der Tabellen findet sich unter „Relative Empfindlichkeit“ eine Vergleichszahl, die ganz grob und ohne Anspruch auf große Genauigkeit das Verhältnis zwischen den Empfindlichkeiten angibt. Ueberall ist die Hämolyse in dem empfindlichsten Medium, den Sulphaten, als Einheit aufgestellt.

Durchgehend ist die Abnahme der Empfindlichkeit viel größer für Vibriolysin als für Natriumlauge. Dieses geht noch deutlicher aus den folgenden Versuchen hervor.

Tabelle III.

Die Hämolyse in den Erdalkalisalzlösungen.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
+ Lysinmengen } 2 Stunden bei 37° C

0,1n NaOH	Aufschwemmungen in				Vibriolysin	Aufschwemmungen in			
	3,2 ‰	1,3 ‰	5,5 ‰	3,2 ‰		3,2 ‰	1,3 ‰	5,5 ‰	3,2 ‰
ccm	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NaNO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7 Aq	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq	ccm	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NaNO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> · 7 Aq	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq
	Hämolyse in ‰					Hämolyse in ‰			
0,25	96	—	—	—	0,8	70	—	—	—
0,2	90	100	—	—	0,65	53	—	—	—
0,19	86	—	—	—	0,4	27	—	—	—
0,18	78	93	89	—	0,25	17	—	—	—
0,16	43	85	80	100	0,2	7	100	—	—
0,15	—	—	76	97	0,18	—	96	—	—
0,14	21	56	73	88	0,16	5	91	—	—
0,13	—	—	54	80	0,12	3	77	—	—
0,12	4	33	47	70	0,1	1	68	100	100
0,11	—	14	33	50	0,08	1	52	93	95
0,1	1	4	27	—	0,065	—	—	74	84
0,09	—	2	6	9	0,04	0	31	40	53
0,08	0,5	1	3	3	0,033	—	—	22	33
0,065	0	1	1	1	0,025	—	6	10	22
0	—	—	—	—	0,016	—	2	2	14
					0,01	—	—	1	3
Relative Empfindlichkeit }	0,7	0,8	0,85	1		0,06	0,6	0,8	1

Tabelle IV.

Die Hämolyse in den Erdalkalisalzlösungen.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
 + Lysinmengen } 2 Stunden bei 37° C

0,1n NaOH	Aufschwemmungen in				Vibriolysin	Aufschwemmungen in			
	3,2 %	1,3 %	0,9 %	3,2 %		3,2 %	1,3 %	0,9 %	3,2 %
ccm	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NaNO <sub>3</sub>	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq	ccm	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NaNO <sub>3</sub>	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq
0,25	100	—	—	—	0,16	20	75	—	—
0,2	80	100	—	—	0,12	7	66	100	—
0,18	65	95	—	—	0,1	6	45	95	100
0,16	35	75	100	—	0,08	1	35	80	95
0,14	20	35	90	100	0,065	0	30	70	88
0,12	10	32	75	95	0,040	—	10	35	40
0,11	10	25	56	75	0,033	—	8	20	36
0,10	8	20	15	45	0,025	—	4	12	20
0,09	8	8	12	40	0,020	—	2	10	10
0,08	4	2	2	12	0,016	—	2	3	2
0,065	0	2	1	3	0	—	0	0	0
0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
Relative Empfindlichkeit	0,5	0,7	0,9	1		0,16	0,4	0,75	1

Besonders bemerkenswert ist hier die geringe Empfindlichkeit der Baryumnitrataufschwemmungen.

Erdalkalisalze, anorganische Säuren, wie Baryum und Magnesiumsalze, erwiesen sich als ungeeignet für die Blutkörperchenaufschwemmung. In den Erdalkalilösungen entstehen Erdalkalimetalloxyde durch Natronlauge. Magnesiumhydroxyd fällt aus; Baryumhydroxyd fällt bald durch Luftkohlensäure als Baryumkarbonat aus. In den beiden Fällen wurde die Hämolyse herabgesetzt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, war die Hämolyse durch Vibriolysin in der Baryumsalzlösung besonders gering. Man beobachtete hier eine weiße Fällung, wahrscheinlich Baryumphosphat aus Kulturbouillon, und das wirksame Prinzip wurde dabei mitgerissen.

Ähnliche Ergebnisse zeigten die folgenden Versuche, Tab. Va und Vb, Tab. VIa und VIb.

Tabelle V a.

Empfindlichkeitsunterschied der Blutkörperchen gegen Lysine in den isotonischen Lösungen verschiedener Substanzen.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
+ Lysin } 2 Stunden bei 37° C

Zugefügte 0,1n NaOH  ccm	Aufschwemmungen in								
	8,9 %	1,7 %	1,3 %	1,5 %	0,9 %	1,4 %	2,5 %	4,5 %	3,2 %
	Milchzucker	HCOONa	NaNO <sub>3</sub>	NaBr	NaCl	COONa — COONa	NaJ	Traubenzucker	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq
0,4	100	—	—	—	—	—	—	—	—
0,33	90	—	—	—	—	—	—	—	—
0,20	85	—	—	—	—	—	—	—	—
0,19	—	100	—	—	—	—	—	—	—
0,18	—	95	100	—	—	—	—	—	—
0,17	—	80	95	100	100	—	—	—	—
0,16	75	75	90	95	95	—	—	—	—
0,15	—	50	67	88	90	100	100	95	—
0,14	—	26	65	72	85	90	95	90	100
0,13	—	12	37	65	80	85	85	85	92
0,12	48	8	20	35	45	60	60	80	80
0,11	—	3	15	18	18	22	40	60	55
0,1	35	1	9	9	13	18	25	50	30
0,09	—	—	—	—	—	7	—	28	10
0,08	8	0	1	2	0	1	2	12	4
0,065	6	—	—	—	—	1	—	10	1
0,05	—	—	—	—	—	0	—	4	0
0,04	5	—	—	—	—	0	0	—	—
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }		0,7	0,8	0,85	0,85	0,9	1	1	1

Tabelle Vb.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
 + Lysinmenge } 2 Stunden bei 37° C

Zugefügtes Vibriolysin	Aufschwemmungen von								
	2,5 %	8,9 %	1,3 %	1,5 %	4,5 %	0,9 %	1,7 %	1,4 %	3,2 %
ccm	NaJ	Milchzucker	NaNO <sub>3</sub>	NaBr	Traubenzucker	NaCl	HCOONa	COONa — COONa	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10Aq
0,65	90	—	—	—	—	—	—	—	—
0,50	88	100	—	—	—	—	—	—	—
0,40	85	95	—	—	—	—	—	—	—
0,33	72	93	—	—	—	—	—	—	—
0,25	60	85	—	—	—	—	—	—	—
0,20	60	52	100	—	—	—	—	—	—
0,18	—	—	95	100	—	—	—	—	—
0,16	45	40	95	97	—	—	—	—	—
0,14	—	—	90	95	—	—	—	—	—
0,13	—	—	84	92	—	—	—	—	—
0,12	35	36	80	90	—	—	—	—	—
0,11	—	—	—	—	80	100	—	—	—
0,1	30	25	70	75	75	95	100	—	—
0,09	—	—	—	—	70	95	97	100	—
0,08	—	—	50	55	65	90	95	95	100
0,065	—	—	—	—	60	80	92	85	96
0,05	7	15	25	40	45	50	80	78	72
0,04	—	—	—	—	30	45	55	65	55
0,033	—	—	—	—	16	27	37	45	35
0,025	4	8	9	3	5	17	35	40	30
0,20	—	—	—	—	1	1	2	3	5
0,01	—	2	1	0	1	1	1	3	4
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }	0,2	0,2	0,5	0,6	0,7	0,8	1	1,2	1



Tabelle VI a.

Empfindlichkeitsunterschied der Blutkörperchen gegen Lysin in den isotonischen Lösungen verschiedener Substanzen.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung } auf 10 ccm aufgefüllt,  
+ Lysin } 2 Stunden bei 37° C

Zugefügte 0,1n NaOH  ccm	Aufschwemmungen in					
	1,7 % HCOONa	1,3 % NaNO <sub>3</sub>	1,5 % NaBr	1,4 % COONa   COONa	2,5 % NaJ	3,2 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10 Aq
0,2	100	—	—	—	—	—
0,19	95	100	—	—	—	—
0,18	—	98	100	—	—	—
0,17	80	90	95	—	—	—
0,16	75	80	85	—	—	—
0,15	52	45	75	100	—	—
0,14	28	38	64	95	100	—
0,13	20	—	—	78	—	100
0,12	5	13	40	50	85	80
0,11	5	—	—	40	—	65
0,10	2	9	4	30	20	40
0,09	—	—	—	—	—	28
0,08	2	1	2	2	4	2
0,065	—	—	—	—	3	3
0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }	0,7	0,75	0,8	0,9	1	1

Es ist auffallend, daß die Breite, d. h. der Unterschied zwischen Dosen mit totaler Hämolyse, 100, und keiner Hämolyse, 0, sehr verschieden in den verschiedenen Medien ist. Für NaOH in Aufschwemmung in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tab. V a) ist sie 0,14 ccm bis 0,05 ccm, während sie in Milchzucker 0,4 ccm bis 0,03 ccm ist.

Gegen Vibriolysin bleibt die Empfindlichkeitsreihenfolge gewöhnlich, aber nicht immer, dieselbe wie gegen Natronlauge.

Tabelle VIb.

8 ccm 2-proz. Pferdeblutkörperchenaufschwemmung { auf 10 ccm aufgefüllt,  
+ Lysin { 2 Stunden bei 37° C.

Zugefügtes Vibriolysin	Aufschwemmungen in					
	2,5 ‰	1,3 ‰	1,5 ‰	1,7 ‰	1,4 ‰	3,2 ‰
ccm	NaJ	NaNO <sub>3</sub>	NaBr	HCOONa	COONa — COONa	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 10Aq
0,22	55	90	100	—	—	—
0,2	50	85	98	—	—	—
0,18	45	80	95	—	—	—
0,16	30	76	90	—	—	—
0,14	30	64	75	—	—	—
0,12	25	53	73	—	—	—
0,10	20	45	60	100	100	100
0,08	16	35	42	85	87	95
0,065	—	—	—	73	75	65
0,04	—	10	18	35	60	45
0,033	—	—	—	—	—	—
0,025	6	3	12	16	10	18
0,016	3	2	4	4	8	4
0,012	—	—	—	2	2	4
0,010	0	—	—	2	2	1
0	0	0	0	0	0	0
Relative Empfind- lichkeit }	0,25	0,5	0,6	1	1	1

Eine Vorstellung hierüber gibt Tab. VII, in der die relativen Empfindlichkeiten aus den verschiedenen Versuchen zusammengestellt. Hier ist wie früher die Empfindlichkeit von den Sulphataufschwemmungen als Einheit gesetzt.

Während die Hämolyse durch NaOH in den Halogenlösungen NaCl, NaBr und NaJ steigend ist, sinkt sie ganz unzweideutig für Vibriolysin.

Durchgehend ist die Hämolyse mit Vibriolysin relativ schwächer als mit Natronlauge. Umgekehrt verhalten sich die Formiataufschwemmungen.

Tabelle VII.

Zusammenstellung der relativen Empfindlichkeit der verschiedenen Versuche.

	NaOH	Vibriolysin
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{Aq}$	1	1
NaCl	0,9	0,8
	0,85	0,8
	0,85	0,75
	0,8	0,75
	M. 0,85	M. 0,78
NaBr	0,85	0,6
	0,8	0,6
	0,8	0,5
	M. 0,82	M. 0,57
NaJ	1	0,25
	1	0,2
	M. 1	M. 0,23
$\text{NaNO}_3$	0,8	0,7
	0,8	0,6
	0,75	0,5
	0,7	0,5
	0,7	0,4
	M. 0,75	M. 0,54
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{Aq}$	0,85	0,8
COONa	1	0,9
	0,9	1,2
COONa		
HCOONa	0,7	1
	0,7	1
Traubenzucker	1	0,7

### Zusammenfassung.

Die Resultate der Untersuchungen über die relative Empfindlichkeit gegen NaOH und Vibriolysin von Pferdeblutkörperchen, aufgeschwemmt in verschiedenen isotonischen Salzlösungen, können folgendermaßen zusammengefaßt werden.

1) Kleine Konzentrationsunterschiede der zur Aufschwemmung der Blutkörperchen benutzte Salzlösungen bedingen nicht größere Unterschiede in der Intensität der von NaOH und Vibriolysin bedingten Hämolyse.

2) Die Empfindlichkeit der Blutkörperchen in isotonischen Natrium- und Kaliumsalzlösungen war ungefähr dieselbe.

3) Die Empfindlichkeit gegen NaOH und Vibriolysin ist nicht dieselbe in Aufschwemmungen verschiedener Lösungen.

Die Empfindlichkeit wurde am größten in den Sulphat-aufschwemmungen gefunden. Wurde diese Empfindlichkeit als Einheit (1) aufgestellt, konnte die Empfindlichkeit in anderen Salzlösungen in Verhältnis hierzu zahlenmäßig ausgedrückt werden, wie in unten stehender Tabelle:

Blutkörperchen- aufschwemmungen in	NaOH relative Empfindlichkeit	Vibriolysin relative Empfindlichkeit
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ Aq}$	1	1,
Traubenzucker	1	0,7
Natriumoxalat	0,95	1,05
NaJ	1	0,23
NaBr	0,82	0,57
NaCl	0,85	0,78
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ Aq}$	0,85	0,8
$\text{NaNO}_3$	0,75	0,54
$\text{HCOONa}$	0,7	1

Durchgehend sind die Aufschwemmungen relativ weniger empfindlich gegen Vibriolysin als gegen NaOH, umgekehrt verhalten sich die Formiat-aufschwemmungen.

In den Halogensalzaufschwemmungen wurde gegen Vibriolysin auffallende Abnahme der Empfindlichkeit von NaCl- bis NaJ-Lösungen beobachtet, während die Empfindlichkeit gegen NaOH nur kleine Änderungen in umgekehrter Richtung zeigte.

#### Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit von v. Eisler und v. Portheim „Ueber ein Häm-agglutinin im Samen von Datura“ (Heft 1) gehört auf Seite 155 die Notiz „sofort Agglutination“ in Spalte 5 zu:

Datura ferox	Datura Metel
„ gigantea	„ Stramonium
„ laevis	„ Wrightii
„ Leichhardtii	

die Notiz „Hämolyse“ gehört zu:

Digitalis purpurea.

## Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. I. No. 3.

[Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie  
in Marburg a/L.]

### Ueber das Vorkommen von Tetanusantitoxin im Blute normaler Rinder.

Von Prof. Dr. Paul H. Römer, Marburg.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Dez. 1908.)

Seit längeren Jahren beschäftige ich mich mit der Frage der intestinalen Antitoxinresorption und verfolgte dieselbe speziell beim saugenden Kalbe genauer vor ca.  $2\frac{1}{2}$  Jahren in Versuchen, die ich zum Teil in Gemeinschaft mit Much (1—4) anstellte. Ueber das Ergebnis dieser Versuche habe ich mehrfach berichtet.

Mit dem Zweck ähnlich gerichteter Untersuchungen prüfte ich im Juli 1908 die Milch einer Kuh (No. 8246) auf Tetanusantitoxin, die zu jenen  $2\frac{1}{4}$  Jahre zurückliegenden Untersuchungen gedient hatte.

Die Kuh 8246 hatte am 8. März 1906 50 ccm Tetanusserum (= 300 AE) und am 15. März 1906 40 ccm Tetanusserum (= 240 AE), insgesamt also 540 AE erhalten. Die Milch des Muttertieres enthielt am 19. März 1906 pro Kubikcentimeter  $\frac{1}{200}$  AE. Auf das junge Kalb gingen durch die Säugung nicht unbeträchtliche Mengen Antitoxin über (vergl. die genannten Arbeiten).

Die gleiche Kuh war inzwischen zum zweiten Male gravid geworden und hatte am 22. Juni 1908 ein gesundes Bullenkalb (No. 219) geboren. Am 14. Juli 1908 erhielt sie wiederum 100 ccm Tetanusserum (= 500 AE) subkutan. Bereits vor dieser Injektion aber war dem Muttertier eine Milchprobe und dem jungen Kalbe eine Blutprobe abgenommen worden. Die Untersuchung beider hatte nachfolgende Ergebnisse:

Tabelle I.

1. Prüfung der Milch von Kuh 8246 vom 14. Juli 1908 unter Benutzung des Tetanusgiftes vom 5. Nov. 1907.

Maus No.	Gewicht	Gift-dosis	Milchmenge	Resultat
5957	15 g	0,002	0,5	glatt
5955	14 "	0,0022	0,5	"
5872	8,5 "	0,0025	0,5	"
Kontrolltiere:				
5988	10,5 "	0,002	—	tot nach 5½ Tagen
5938	13,0 "	0,0022	—	" " 3½ "
5934	16,0 "	0,0025	—	" " 60 Stunden

Tabelle II.

2. Prüfung des Serums des Kalbes 219 vom 14. Juli 1908.

Maus No.	Gewicht	Gift-dosis	Serumdosis	Resultat
a) mit Hilfe des Tetanusgiftes vom 5. Nov. 1907.				
5954	14 g	0,002	0,5	glatt
5917	11 "	0,0022	0,5	"
5879	18 "	0,0025	0,5	"
(Kontrolltiere siehe obige Milchprüfung.)				
b) mit Hilfe des Tetanusgiftes vom 20. Mai 1908.				
5973	12,5 g	0,00004	0,5	glatt
5974	14,5 "	0,00008	0,5	"
5979	16,0 "	0,0008	0,5	"
5984	13,5 "	0,00275	0,5	"
5983	11,5 "	0,0055	0,5	tot nach 48 Stunden
5985	10,5 "	0,0055	0,1	" " 24 "
Kontrolltiere:				
5866	19,5 "	0,00004	—	tot nach 8 Tagen
5931	15,0 "	0,00008	—	" " 3 "

Es ist demnach kein Zweifel, daß bereits vor der erneuten Tetanusantitoxin-Injektion sich Tetanusantitoxin in der Milch des Muttertieres befand. Leider konnte die Menge desselben nicht genau bestimmt werden, da die Milch während der Auswertung sauer wurde und gerann, von vornherein war aber keine größere Prüfungsreihe angesetzt worden, da ich kein Antitoxin in der Milch vermutete. Aus dem gleichen Grunde war es leider auch unterblieben, eine Blutprobe dem Muttertiere vor der Tetanusserum-Injektion abzunehmen und zu prüfen. Der Tetanusantitoxingehalt der Milch findet aber gewissermaßen eine Ergänzung und Bestätigung durch den Nachweis der nicht un-

beträchtlichen Mengen von Tetanusantitoxin, die sich im Blute des von der Kuh 8246 gesäugten Kalbes fanden. Offenbar entstammt dieses Antitoxin des Kalbblutes der Säugung, denn intrauterin geht, wie Verf. in zahlreichen Versuchen festgestellt hat (vergl. unter anderem die oben zitierten Arbeiten), antitoxisches Serum beim Rinde nicht auf den Foetus über.

Es lag zunächst die Annahme nahe, daß dieser unzweifelhafte Antitoxingehalt der Milch des Muttertieres noch herrühre von jenen über 2 Jahre zurückliegenden Seruminjektionen. Denn normalerweise finden wir im Blute von Tieren, die noch nicht künstlich mit lebendem Tetanusvirus, Tetanusgift oder Tetanusserum in Berührung gebracht sind, keine Spur von Tetanusantitoxin. Es gilt oder galt bisher geradezu als Dogma, daß normale Tiere nie Tetanusantitoxin im Blute enthalten. So schreibt Hamburger (5): „Andererseits habe ich nie in dem Blut normaler Tiere und Menschen auch nur eine Spur von Tetanusantitoxin gefunden.“ Es entspricht dies auch meinen eigenen bisherigen Erfahrungen. Der Gedanke also, den Antitoxinbefund bei der Kuh 8246 auf jene  $2\frac{1}{4}$  Jahre zurückliegende Seruminjektion zu beziehen, schien zunächst am meisten naheliegend. Andererseits aber mußte diese lange Persistenz des Tetanusantitoxins im Blute jener Kuh sehr auffallen. Das Antitoxin rührte ja her von einem Pferde, es war also geknüpft an das Bluteiweiß einer anderen Tierart, und durch die Untersuchungen v. Behrings (6) und Ransoms (7) wissen wir, daß zwar homologes, an artgleiches Eiweiß geknüpftes Antitoxin sich lange im Organismus halten kann, daß dagegen heterologes Antitoxin ziemlich rasch ausgeschieden wird, so daß selbst nach Injektion großer Antitoxindosen wir in der Regel nach spätestens 2 Monaten das Blut des antitoxinbehandelten Tieres frei von Antitoxin finden, wenn sein Blutantitoxin an heterologes Eiweiß geknüpft war. Es ist ja auch ganz verständlich, daß artfremdes Eiweiß für den Organismus wie ein Fremdkörper ist, dessen er sich bald zu entledigen sucht. Angesichts dieser Erfahrungen war also die ungewöhnlich lange, scheinbare Persistenz des Pferdeantitoxins im Körper des Rindes außerordentlich auffallend und überraschend; trotzdem hielt ich zunächst diese Annahme für die wahrscheinliche.

Ich suchte sie daher noch des näheren zu stützen. Wenn in der Tat das Antitoxin in der Milch der Kuh 8246 noch von jener früheren Seruminjektion herrührte, dann war es möglich, daß wir es noch geknüpft an Pferdeeiweiß fanden. Wir mußten also Pferdeeiweiß in der antitoxischen Milch nachweisen können. Dies gelang zunächst nicht mit der Präzipitinreaktion, d. h. durch Zusatz eines vom Kaninchen gewonnenen, Pferdeeiweiß präzipitierenden Serums zu der aus der Milch der Kuh 8246 gewonnenen klaren Molke. Dieses Ergebnis war indessen nicht überraschend, da aus einer ungefähren Berechnung aus dem Antitoxingehalt sich schon ergab, daß die Menge Pferdeeiweiß, die in der Milch eventuell hätte vorhanden sein können, viel zu gering gewesen wäre, um direkt mit der Präzipitinreaktion nachgewiesen werden zu können. Ich versuchte daher den Nachweis des Pferdeeiweißes mit der sog. Komplementbindungsreaktion. Als hämolytisches System verwandte ich ein durch Behandlung von Kaninchen mit Rinderblut gewonnenes Immunsorum mit Zusatz von frischem Meerschweinchen-sorum. Der Titer des Immunsorums entsprach  $\frac{1}{400}$  ccm d. h.  $\frac{1}{400}$  ccm Immunsorum (Ambozeptor) + 0,1 ccm Meerschweinchen-sorum (Komplement) + 1 ccm 5-proz. Rinderblut ergab vollständige Hämolyse. Kleinere Dosen genügten nicht zur kompletten Hämolyse.

Ich ging in folgender Weise vor: 50 ccm Milch der Kuh 8246 vom 14. Juli 1908, also gewonnen vor der erneuten Tetanusantitoxin-Injektion, wurden versetzt mit 150 ccm destillierten Wassers, dann 6 Tropfen Eisessig zugesetzt und hierauf klar filtriert. Das klare Filtrat wurde sodann noch durch Zusatz von 0,85 Proz. Kochsalz isotonisch gemacht (Molke 1).

In der gleichen Weise wird eine Molke 2 hergestellt, indem zu 100 ccm der Milch der Kuh 8246 vom 14. Juli 1908  $\frac{1}{200}$  ccm Tetanusserum (=  $\frac{1}{40}$  AE oder  $\frac{1}{4000}$  AE pro Kubikcentimeter) zugesetzt und dann genau so, wie eben geschildert, die Molke bereitet wurde (= Molke 2).

Diese zwei Molken wurden dann gegenüber einem vom Kaninchen gewonnenen Pferdeantiserum auf ihre Komplementbindungsfähigkeit geprüft. Der Versuch ist durch die nachfolgende Tabelle illustriert:



Tabelle III.

Molke No.	Antiserum	Komplement		Ambozeptor	Blut	Ergebnis
—	—	—	1 <sup>h</sup> bei 37°	—	1 ccm 5-proz. Rinder- blut	0
—	—	—		1 ccm 1/200 Immun- serum	dto.	0
—	—	1 ccm 1/10 Meerschwein- chenserum		dto.	„	komplett
—	0,1 ccm Pferdeanti- serum	dto.		„	„	„
0,5 ccm Molke 1	—	„		„	„	„
0,5 ccm Molke 2	—	„		„	„	„
0,5 ccm Molke 1	0,1 ccm Pferdeanti- serum	„		„	„	„
0,5 ccm Molke 2	dto.	„		„	„	0

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt also, daß sich auch mit dieser fein arbeitenden Methode kein Pferdeeiweiß in der Milch der Kuh 8246 nachweisen ließ. Wie fein die Methode arbeitet, zeigt der Ausfall des Versuches mit der Molke 2, wo eine ganz geringe Menge Pferdeserum künstlich zugesetzt war. Die Menge Pferdeeiweiß, die sich in 1 ccm der untersuchten Molke No. 2 fand, beträgt nach einer einfachen Berechnung ca.  $\frac{1}{8000000}$  g.

Nun haben in früheren Versuchen Much und ich (1 und 2) nachgewiesen, daß bei Kühen subkutan injiziertes Pferdeantitoxin in der Milch in einer Form erscheinen kann, in der es nicht mehr als Pferdeserum erkennbar ist, auch nicht mit diesen feinen biologischen Methoden. Ich hielt deshalb immer noch an der Meinung fest, daß bei jener Kuh der Tetanusantitoxingehalt der Milch von der früheren Injektion herrühren müsse. Das Ergebnis der letzten biologischen Untersuchungen aber veranlaßte mich, das Blut der übrigen, im gleichen Bestande vorhandenen Rinder auf den eventuellen Gehalt von

Tetanusantitoxin zu prüfen. Wieder, wie ich gestehen will, in der Absicht, meine Meinung zu stützen, daß jener überraschende Antitoxinbefund auf einer ungewöhnlich langen Persistenz des Tetanusantitoxins im Blute jener Kuh beruhte.

Diese Untersuchungen fanden im Oktober und November 1908 statt, und dabei wurde gleichzeitig noch einmal das Serum der Kuh 8246 und des von ihr gesäugten Kalbes 219 auf Antitoxin geprüft, nachdem also inzwischen 3 Monate nach der letzten Antitoxininjektion vergangen waren. Sämtliche Sera wurden ganz schematisch nach dem gleichen Verfahren und mit Hilfe des gleichen Tetanusgiftes auf Antitoxin geprüft. Sie kamen frisch, d. h. am Tage der Abnahme zur Verwendung, aber nur, worauf ich besonderen Wert lege, in völlig klarem Zustand. Alle Sera wurden zunächst geprüft in Mischung mit der einfach tödlichen Minimaldosis des benutzten Tetanusgiftes. Ergab sich am nächsten Tage ein Unterschied zu der immer gleichzeitig injizierten Kontrollmaus (die die tödliche Minimaldosis, gemischt mit dem entsprechenden Quantum physiologischer Kochsalzlösung, erhielt), so wurde das Serum gleich auf höhere Werte geprüft durch Mischung mit steigenden Giftdosen.

Jede einzelne Prüfung erfolgte genau wie die andere nach folgendem Schema: 0,6 ccm des klaren Serums wurden vermischt mit 0,2 ccm der Giftverdünnung und dann  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $37^{\circ}$  gehalten. Hierauf wurden gesunden Mäusen 0,4 ccm dieser Mischung subkutan injiziert. Zu allen Prüfungen wurde das gleiche Tetanusgift (Tet.G.M. vom 20. Mai 1908) benutzt.

Die Prüfung des benutzten Tetanusgiftes (Tet.G.M. vom 20. Mai 1908) ergab folgende Werte:

Tabelle IV.  
a) Direkter Giftwert

Maus No.	Gewicht	Giftdosis	Ergebnis
5997	16,0 g	0,00001	geringer Tetanus, erholt sich
5996	16,0 "	0,00001	mäßiger Tetanus, erholt sich
6000	14,5 "	0,00002	" " " "
5989	14,0 "	0,00004	tot nach 78 "Stunden"
6009	12,0 "	0,00004	" " 82 "
5992	15,5 "	0,00008	" " 72 "
5991	13,0 "	0,0001	" " 60 "

Es enthielt also 1 ccm des Giftes ungefähr die tödliche Minimaldosis für 400 000 g Maus (1 ccm = 400 000 + Ms) oder 0,00004 g repräsentiert die tödliche Minimaldosis für eine Maus von mittlerem Gewicht.

Tabelle V.

## b) Indirekter Giftwert.

Als Testserum für die Einstellung des Giftes diene ein in seinem Wert seit Jahren unverändertes sechsfaches Tetanusserum (No. 70).

Maus No.	Gewicht	Giftosis	Antitoxindosis	Ergebnis
5995	13,5 g	0,005	$\frac{1}{8000}$ ccm	geringer Tetanus, erholt sich
5994	14,5 „	0,006	$\frac{1}{8000}$ „	tot nach 5 Tagen
6008	11,0 „	0,00625	$\frac{1}{8000}$ „	„ „ 4 „

Es entsprach also die Dosis von 0,00625 =  $\frac{1}{1600}$  Gift-einheit, d. h. der Dosis, die von  $\frac{1}{1000}$  AE unter den oben genannten Bedingungen zu L<sub>+</sub> im Mäuseversuch neutralisiert wird.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurden nun vielfach kleinere Antitoxinmengen als  $\frac{1}{1000}$  AE ermittelt, infolgedessen mußten auch kleinere Gift Dosen als 0,00625 g zur Auswertung benutzt werden. Nun ist aber bekannt, daß zwar  $\frac{1}{1000}$  Gifteinheit von  $\frac{1}{1000}$  AE zu L<sub>+</sub> neutralisiert wird, daß aber mit geringerem Giftgehalt der relative Antitoxinbedarf größer wird. Es mußte deshalb erst für die kleineren Gift Dosen die Antitoxindosis ermittelt werden, welche mit ihnen L<sub>+</sub> ergab. Summarisch berichtet ergab sich, daß von unserem Tetanusgift zu L<sub>+</sub> neutralisiert wurden:

0,00625	von $\frac{1}{1000}$ AE	0,001	von $\frac{1}{4000}$ AE
0,005	„ $\frac{1}{1250}$ „	0,0008	„ $\frac{1}{5000}$ „
0,003	„ $\frac{1}{3000}$ „	0,0005	„ $\frac{1}{8500}$ „
0,002	„ $\frac{1}{2500}$ „	0,0004	„ $\frac{1}{8000}$ „

Da der direkte Giftwert des Tetanusgiftes während der gesamten Versuchsdauer eine geringe Abschwächung erfuhr, wurde die tödliche Minimaldosis von 0,00004 ccm auf 0,00005 erhöht. Sämtliche Prüfungen sind in der nachfolgenden Tabelle vereinigt. Der besseren Uebersicht halber sind die Nummern der Rinder, bei denen Antitoxin nachgewiesen wurde, in *Kursivschrift* wiedergegeben.

Tabelle VI.

Datum des Versuchs	Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Serum von Rind No.	Ergebnis
19. X. 08	6000	14,0	0,00002	—	mäß. Tet., erholt sich
"	5989	14,0	0,00004	—	† nach 3 1/2 Tagen
"	5999	14,0	0,00002	0,3 ccm Rd. 72	mäß. Tet., erholt sich
"	5998	13,5	"	" " " 8246	glatt
"	6016	11,5	0,00004	" " " "	"
"	6014	12,0	0,00008	" " " "	"
"	6023	15,5	0,0004	" " " "	"
"	6034	16,5	0,0008	" " " "	"
"	6036	14,5	0,00625	" " " "	Spur Tetanus
"	6050	15,5	"	0,2 " " "	† nach 3 Tagen
"	6047	14,0	"	0,1 " " "	† " 36 Stunden
"	6042	15,0	"	0,01 " " "	† " 18 "
"	6002	13,5	0,00002	0,3 " " 81	glatt
"	6015	11,5	0,00004	" " " "	"
"	6013	12,0	0,00008	" " " "	"
"	6024	15,5	0,0004	" " " "	Spürchen Tetanus
"	6030	16,5	0,0008	" " " "	† nach 3 1/2 Tagen
"	6037	14,0	"	0,2 " " "	† " 3 "
22. X. 08	6009	12,0	0,00004	—	† nach 4 Tagen
"	6026	10,5	"	0,3 ccm Rd. 194	† " 3 1/2 "
"	6025	10,5	"	" " " 195	† " 3 1/2 "
"	6032	13,0	"	" " " 197	† " 4 "
24. X. 08	6043	12,5	0,00004	—	† nach 4 Tagen
"	6045	12,5	"	0,3 ccm Rd. 204	† " 3 1/2 "
"	6044	12,5	"	" " " 226	† " 3 1/2 "
"	6046	13,0	"	" " " 207	† " 3 1/2 "
"	6048	14,0	"	" " " 219	glatt
"	6040	18,5	0,0004	" " " "	geringer Tet., erholt sich
"	6053	14,5	"	0,2 " " "	† nach 3 1/2 Tagen
"	6041	15,0	0,004	0,3 " " "	† " 24 Stunden
26. X. 08	6049	15,5	0,00004	—	† nach 4 1/2 Tagen
"	6033	14,5	"	0,3 ccm Rd. 185	glatt
"	6038	14,5	0,00008	" " " "	"
"	6039	14,5	0,0008	" " " "	"
"	6078	13,0	0,005	" " " "	geringer Tetanus
"	6061	16,0	"	0,2 " " "	† nach 3 1/2 Tagen
"	6058	14,0	0,00004	0,3 " " 201	† " 3 1/2 "
"	6057	13,0	"	" " " 224	† " 3 1/2 "
"	6056	13,0	"	" " " 188	† " 3 1/2 "
"	6054	14,5	"	" " " 205	† " 3 1/2 "
30. X. 08	6069	14,5	0,00005	—	† nach 3 1/2 Tagen
"	6070	14,5	"	0,3 ccm Rd. 209	† " 3 1/2 "
2. XI. 08	6087	12,0	0,00005	—	† nach 3 1/2 Tagen
"	6084	13,0	"	0,3 ccm Rd. VIII	† " 3 "
"	6083	14,5	"	" " " I	† " 4 "

## Vorkommen von Tetanusantitoxin im Blute normaler Rinder. 371

Datum des Versuchs	Maus No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serum von Rind No.	Ergebnis
2. XI. 08	6092	14,0	0,00005	0,3 ccm Rd. 116	glatt
"	6103	12,5	0,0004	" " " "	geringer Tetanus
"	6105	13,0	0,0006	" " " "	+ nach 7 Tagen
"	6120	13,0	0,0008	" " " "	+ " 3 "
"	6075	12,5	0,002	" " " "	+ " 36 Stunden
7. XI. 08	6090	14,5	0,00005	—	+ nach 4 Tagen
"	6098	15,5	"	0,3 ccm Rd. 85	+ " 3 1/2 "
"	6099	13,0	"	" " " 109	+ " 3 1/2 "
"	6052	15,0	"	" " " 189	glatt
"	6104	14,5	0,0004	" " " "	"
"	6106	15,5	0,0008	" " " "	Spürchen Tetanus
"	6012	12,5	0,001	" " " "	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6074	12,0	0,002	" " " "	+ " 36 Stunden
12. XI. 08	6095	15,0	0,00005	—	+ nach 4 Tagen
"	6117	12,5	"	0,3 ccm Rd. 210	+ " 3 1/2 "
"	6116	12,0	"	" " " 227	+ " 4 "
"	6118	13,0	"	" " " 133	glatt
"	6024	15,5	0,0005	" " " "	"
"	6122	12,5	0,001	" " " "	"
"	6073	14,5	0,005	" " " "	"
"	6119	16,5	0,00625	" " " "	"
"	6135	15,0	"	0,2 " " "	"
"	6072	12,5	"	0,1 " " "	+ nach 36 Stunden
17. XI. 07	6136	13,5	0,00005	—	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6137	13,5	"	0,3 ccm Rd. 122	+ " 3 1/2 "
"	6139	13,0	"	" " " 134	+ " 3 1/2 "
"	6141	13,0	"	" " " 8237	+ " 3 1/2 "
"	6140	16,0	"	" " " 180	glatt
"	6079	15,5	0,0005	" " " "	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6138	13,5	0,00005	" " " 97	glatt
"	6082	14,0	0,0005	" " " "	"
"	6158	12,0	0,002	" " " "	+ nach 4 Tagen
20. XI. 08	6163	12,0	0,00005	—	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6161	12,0	"	0,3 ccm Rd. 199	+ " 3 1/2 "
"	6162	11,0	"	" " " 129	+ " 3 1/2 "
"	6159	12,5	"	" " " 94	+ " 3 1/2 "
"	6160	14,0	"	" " " 182	glatt
"	6165	13,0	0,0002	" " " "	Spur Tetanus
"	6166	13,5	0,0004	" " " "	+ nach 4 Tagen
"	5997	16,0	0,0005	" " " "	+ " 66 Stunden
26. XI. 08	6089	16,0	0,00005	—	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6086	12,5	"	0,3 ccm Rd. III	+ " 3 1/2 "
"	6085	13,0	"	" " " IV	+ " 3 1/2 "
"	6060	15,5	"	" " " 221	glatt
"	6014	12,0	0,0002	" " " "	geringer Tetanus
"	6100	12,5	0,0004	" " " "	+ nach 3 1/2 Tagen
"	6097	12,5	0,0008	" " " "	+ " 36 Stunden
"	6080	17,0	0,00005	" " " 187	glatt
"	6015	11,5	0,0002	" " " "	"

Datum des Versuchs	Maus No.	Ge- wicht g	Gift- dosis	Serum von Rind No.	Ergebnis
26. XI. 08	6091	14,0	0,0008	0,3 ccm Rd. 187	geringer Tetanus
"	6101	12,5	0,00125	" " " "	† nach 60 Stunden
"	6034	16,0	0,002	" " " "	† " 54 "
"	6073	14,5	0,00005	" " " 218	glatt
"	6013	12,0	0,0002	" " " "	"
"	6094	14,0	0,0008	" " " "	"
"	6035	14,5	0,002	" " " "	† nach 3 1/2 Tagen
"	6074	12,0	0,00005	" " " 110	glatt
"	5998	13,5	0,0002	" " " "	"
"	6093	16,0	0,0008	" " " "	"
"	6102	12,0	0,0016	" " " "	† nach 60 Stunden
"	6023	15,0	0,002	" " " "	† " 60 "
"	6075	12,0	0,00005	" " " 220	glatt
"	6016	11,5	0,0002	" " " "	"
"	6096	15,5	0,0008	" " " "	† nach 3 1/2 Tagen
"	6023	14,5	0,002	" " " "	† " 18 Stunden

Ein Ueberblick über die Tabelle ergibt also, daß bei einer nicht unbeträchtlichen Zahl von Rindern Tetanusantitoxin im Blute gefunden wurde. Wir müssen uns aber die Frage vorlegen, ob wir es bei der entgiftenden Wirkung dieser Rindersera mit echtem Tetanusantitoxin zu tun haben oder nur mit einer entgiftenden Wirkung nicht spezifischer Art, so wie etwa nach Wassermanns Versuch normales Meerschweinchengehirn das Tetanusgift entgiftet. Die Annahme einer ähnlichen nicht spezifischen Entgiftung wäre angesichts des konzentrierten Serumzusatzes in den Mischungen nicht ganz zurückzuweisen. Bei den Seris der Rinder 133, 185 und 8246 war allerdings eine solche Annahme einer nicht spezifischen Entgiftung des Tetanusgiftes unwahrscheinlich, da sie so beträchtliche Giftmengen neutralisierten. Ich suchte aber trotzdem noch eigens in einer Reihe von Stichproben festzustellen, ob in der Tat sich echtes Antitoxin in den Seris der Rinder mit positivem Antitoxinbefund nachweisen ließ.

Es geschah das in der Weise, daß das Serum vor dem Gift injiziert wurde, und zwar intraperitoneal, während das Gift 24—30 Stunden später subkutan eingespritzt wurde. Es war also eine direkte Berührung zwischen Serum und Gift unmöglich, deshalb auch eine nicht spezifische entgiftende Wirkung wohl ziemlich ausgeschlossen.

Allerdings gibt Wassermann (8) an, auch durch präventive Injektion von Gehirnschubstanz gegen Tetanusgift im-

munisiert zu haben. Seine Angaben konnten aber von Metschnikoff (9), Marie (10), Assacawa (11) und Wolff-Eisner (12) nicht bestätigt werden. Auch nach unseren Erfahrungen ist eine Entgiftung von Tetanusgift durch eine vorherige Injektion nicht spezifisch entgiftender Substanzen nicht möglich.

Die nachfolgenden Tabellen enthalten die in dieser Richtung angestellten Versuche. Die Nummern der Rinder, welche bei den obigen Prüfungen antitoxinhaltig befunden wurden, sind auch hier wieder in *Kursivschrift* wiedergegeben.

Tabelle VIII.

Maus No.	Gewicht g	Serumdosis intraperitoneal	28 Stunden später Gift-dosis subkutan	Ergebnis
6115	13,5	0,5 ccm Rd. 72 Serum	0,00006	† nach 60 Stunden
6114	13,0	0,5 „ dgl.	0,0001	† „ 36 „
6111	11,5	0,5 ccm $\frac{1}{5000}$ antitoxisches Pf.-Serum (= $\frac{1}{2500}$ AE)	0,00006	glatt
6109	14,0	0,5 ccm dgl.	0,0001	Spürchen Tetanus
6112	14,0	0,5 ccm Rd. 218 Serum	0,00006	glatt
6113	13,0	0,5 „ dgl.	0,0001	„

Es schützte also das Serum von Rind 218, das nach obiger Berechnung etwa  $\frac{1}{800}$  AE pro Kubikcentimeter enthielt, vor der mindestens doppelt tödlichen Tetanustoxindosis; es schützte mindestens ebenso, wie ein auf ungefähr den gleichen Antitoxingehalt verdünntes antitoxisches Pferdeserum.

Die nachfolgenden Versuche wurden in entsprechender Weise angestellt.

Tabelle IX.

Maus No.	Gewicht g	Serumdosis intraperitoneal	24 Stunden später Gift-dosis subkutan	Ergebnis
6107	14,0	0,5 ccm Rd. 210 Serum	0,0000625	† nach 48 Stunden
6027	12,5	0,5 „ „ 227 „	0,0000625	† „ 48 „
6128	13,5	0,5 „ „ 133 „	0,0000625	glatt
6127	13,5	0,5 „ „ 116 „	0,0000625	geringer Tetanus, erholt sich
6126	13,5	0,5 „ „ 189 „	0,0000625	geringer Tetanus, erholt sich
6124	13,0	0,5 „ „ 221 „	0,0000625	mäßiger Tetanus, erholt sich
6123	13,0	0,5 „ „ 187 „	0,0000625	mäßiger Tetanus, erholt sich

Auch in diesen Versuchen ergibt sich eine deutlich schützende Wirkung des Serums der untersuchten Rinder. Bei Rind 133 schützte die Dosis entsprechend dem nachgewiesenen hohen Antitoxingehalt völlig gegenüber der Gift-dosis von 0,0000625 ccm. Die anderen Serumsorten schwächten den Tetanus erheblich ab, verglichen mit den Kontrolltieren, bei denen ein rascher Tetanustod erfolgte. Wie aus der vorhergehenden Tabelle hervorgeht, konnte ja auch mit einem Serum mit nur  $\frac{1}{2400}$  AE pro Kubikcentimeter, wie es das des Rindes 221 war, kein völliger Schutz mehr gegenüber der angewandten Giftdosis erwartet werden.

- Zur Ergänzung dieser Versuche sowohl, als auch um weitere antitoxinfrei befundene Sera anderer Rinder zu untersuchen, wurden noch weitere Versuche angestellt, in denen zugleich die schützende Wirkung der stärker antitoxinhaltigen Sera der Rinder 133, 185 und 8246 genauer ausgetriert werden sollte im Vergleich mit einem antitoxischen Pferdeserum von bekanntem Antitoxingehalt.

Tabelle X.

Maus No.	Gewicht g	Serumdosis intraperitoneal	30 Stunden später Gift-dosis subkutan	Ergebnis
6157	11,5	0,5 ccm Rd. 85 Serum	0,00005	† nach $3\frac{1}{2}$ Tagen
6154	14,0	0,5 „ „ 109 „	0,00005	† „ 3 „
6143	12,5	0,5 ccm $\frac{1}{8000}$ antitoxisches Pf.-Serum (= $\frac{1}{2500}$ AE)	0,00005	glatt
6142	14,0	0,5 ccm $\frac{1}{10000}$ antitoxisches Pf.-Serum (= $\frac{1}{5000}$ AE)	0,00005	Spürchen Tetanus, erholt sich
6156	12,0	0,5 ccm Rd. 81 Serum	0,00005	glatt
6155	13,5	0,5 „ „ 116 „	0,00005	geringer Tetanus, erholt sich
6154	12,0	0,5 „ „ 189 „	0,00005	Spur Tetanus, erholt sich
6153	13,0	0,5 „ „ 221 „	0,00005	geringer Tetanus, erholt sich
6152	13,0	0,5 „ „ 187 „	0,00005	Spürchen Tetanus, erholt sich
6151	13,5	0,2 „ „ 133 „	0,00005	glatt
6150	13,5	0,1 „ „ 133 „	0,00005	„
6149	13,0	0,05 „ „ 133 „	0,00005	Spürch. Tetanus (?)
6148	13,5	0,2 „ „ 8246 „	0,00005	glatt
6147	14,0	0,1 „ „ 8246 „	0,00005	„
6146	13,5	0,05 „ „ 8246 „	0,00005	Spürchen Tetanus
6145	15,5	0,2 „ „ 185 „	0,00005	glatt
6134	13,0	0,05 „ „ 185 „	0,00005	geringer Tetanus, erholt sich
6144	13,0	—	0,00005	† nach 3 Tagen



Es hat also die Untersuchung von insgesamt 9 nach den früheren Versuchen als antitoxinhaltig befundenen Seris (218, 133, 116, 189, 221, 187, 81, 8246, 185) deutliche Schutzwirkung ergeben, etwa entsprechend der eines auf ungefähr den gleichen Antitoxingehalt verdünnten Tetanusserums von bekanntem Antitoxingehalt, während die 5 untersuchten, früher als antitoxinfrei befundenen Rindersera (72, 210, 227, 85, 109), in der gleichen Weise angewandt, den Zeitpunkt des Todes bei den Kontrolltieren auch nicht eine Spur hinausschoben. Schon nach dem Ausfall dieser Versuche ist es wohl kein Zweifel mehr, daß es sich um echtes Antitoxin bei jener entgiftenden Wirkung im Mischungsversuch gehandelt hat.

Um aber jedem Einwand zu begegnen, daß es sich hier um eine nicht spezifische Serumwirkung, speziell der in dieser Richtung zu beachtenden Lipide, handelt, wurde noch folgender Versuch gemacht:

10 ccm des Serums von Rind 133 wurden eingetragen in 40 ccm absoluten Alkohol. Der entstandene Niederschlag (Serumeiweiß) wurde hierauf 10mal gründlich mit absolutem Alkohol gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Es ergaben sich 0,82 g Trockensubstanz. Dieselben wurden in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und auf Antitoxinwirkung untersucht. Die nachfolgende Tabelle enthält das Ergebnis.

Tabelle XI.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	ccm der Eiweißlösung	Resultat
6145	15,5	0,000625	0,3 ccm	glatt
6175	12,5	0,000625	0,1 "	"
6073	14,5	0,00625	0,3 "	+ nach 60 Stunden
6024	15,5	0,00625	0,1 "	+ " 24 "
6172	12,5	0,00005	—	+ " 3½ Tagen

Es ist also die gesamte antitoxische Wirkung des Serums Rind 133 auf den von Lipiden sicherlich gänzlich befreiten Eiweißniederschlag zu beziehen, wie ein Vergleich mit der Prüfung des Originalserums 133 am 12. November (vergl. Tabelle VI) ergibt.

Aus allen vorhergehenden Untersuchungen können wir also resümieren, daß sich bei 15 von 41 untersuchten Rindern echtes Tetanusantitoxin im Blute gefunden hat.

Aus dem Ergebnis vorstehend verzeichneter Versuche habe ich in den Fällen, in welchen Antitoxin im Blute der Rinder festgestellt wurde, eine Berechnung der Antitoxinmenge pro Kubikcentimeter Serum angestellt, entsprechend den für das benutzte Gift festgestellten Neutralisierungsformeln (vergl. S. 369). Weiter habe ich in der nachfolgenden Zusammenstellung das Ergebnis bei den noch nicht 2-jährigen Rindern in einer besonderen Tabelle vereinigt und ebenso besonders abgetrennt das Resultat bei den 2-jährigen und älteren Rindern. Weiter enthält die Tabelle die genauen Altersangaben der betreffenden Tiere, sowie Angaben über

Tabelle XII.

Gesamtergebnis der Blutuntersuchungen bei den noch nicht 2 Jahre alten Rindern.

Rind No.	Alter	No. des Mutter-tieres	Rasse	Im Stall seit	Tetanus-antitoxin-menge pro 1 ccm Blutserum
194	1 Jahr 8 Mon.	97	Ostpreuße	der Geburt	keine Spur
195	1 " 10 "	85	Vogelsberger Kreuzung Ostpreuße	" "	" "
197	1 " 9 1/2 "	8237	Ostpreuße	" "	" "
204	1 " 4 "	129	"	" "	" "
226	— " 1 "	109	"	" "	" "
207	1 " 3 "	72	"	" "	" "
			Simmenthal. Kreuzung Ostpreuße		
188	1 " 11 "	134	"	" "	" "
205	1 " 4 "	138	"	" "	" "
201	1 " 6 "	110	"	" "	" "
224	— " 2 "	180	"	" "	" "
209	1 " 1 "	109	"	" "	" "
I	— " 4 1/2 "	angekauft	"	1 Monat	" "
III	— " 4 1/2 "	"	Vogelsberger	1 "	" "
IV	— " 3 1/2 "	"	"	1 "	" "
			Simmenthal. Kreuzung Vogelsberger Ostpreuße		
VIII	— " 5 1/2 "	"	"	1 "	" "
199	1 " 8 "	94	Ostpreuße	der Geburt	" "
221	— " 3 1/2 "	183	"	" "	1/2400 AE
219	— " 4 "	8246	"	" "	1/1800 AE

die Rasse und Abstammungsverhältnisse, Momente, die für die theoretische Beurteilung der Frage, wie wir später sehen werden, vielleicht von einer gewissen Bedeutung sind. Endlich sei darauf aufmerksam gemacht, daß auch in den beiden Tabellen XII und XIII die Nummern der Rinder, bei denen Antitoxin gefunden wurde, in *Kursivschrift* wiedergegeben sind, die Nummern der anderen Rinder in gewöhnlichem Druck; die Nummern derjenigen Muttertiere, deren Blut nicht geprüft werden konnte, da sie nicht mehr vorhanden waren, sind in Klammern beigelegt (siehe Tabelle XII und XIII).

Tabelle XIII.  
Blutuntersuchungen bei den 2-jährigen und älteren Rindern.

Rind No.	Alter	No. des Muttertieres	Rasse	Im Stall seit	Tetanusantitoxinmenge pro 1 ccm Blutserum
72	9 Jahre	angekauft	Simmenthal.	8 Jahren	keine Spur
85	7 „ 5 Monate	„	Simmenthal.	5 „	„ „
109	5 „ 11 „	„	Kreuzung Ostpreuße	4 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> „	„ „
210	3 „ 6 „	„	Vogelsberger Kreuzung	1 „	„ „
227	4 „ 1 „	„	dgl.	8 Tagen	„ „
122	5 „ — „	„	Ostpreuße	4 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> Jahren	„ „
134	5 „ 1 „	„	„	4 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> „	„ „
8237	5 „ 11 „	„	„	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	„ „
129	5 „ 2 „	„	„	4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	„ „
94	6 „ 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	„	„	5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	„ „
187	2 „ 2 „	(135)	„	der Geburt	1 <sup>1</sup> / <sub>1200</sub> AE
218	8 „ — „	angekauft	Vogelsberger	3 Monaten	1 <sup>1</sup> / <sub>800</sub> „
110	5 „ 2 „	„	Ostpreuße	5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	1 <sup>1</sup> / <sub>1900</sub> „
220	2 „ 5 „	„	Holländer	4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	1 <sup>1</sup> / <sub>1500</sub> „
185	2 „ 5 „	122	Ostpreuße	der Geburt	1 <sup>1</sup> / <sub>270</sub> „
116	5 „ 6 „	angekauft	„	5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Jahre	1 <sup>1</sup> / <sub>1500</sub> „
189	2 „ 1 „	116	„	der Geburt	1 <sup>1</sup> / <sub>1900</sub> „
133	5 „ 2 „	angekauft	„	5 Jahren	1 <sup>1</sup> / <sub>150</sub> „
81	5 „ — „	„	Simmenthal. Kreuzung	4 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> „	1 <sup>1</sup> / <sub>1500</sub> „
97	6 „ — „	„	Ostpreuße	4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> „	1 <sup>1</sup> / <sub>800</sub> „
180	2 „ 9 „	(8935)	„	der Geburt	1 <sup>1</sup> / <sub>2000</sub> „
182	2 „ 7 „	110	„	„	1 <sup>1</sup> / <sub>3400</sub> „
8246	5 „ 10 „	angekauft	„	3 Jahren	1 <sup>1</sup> / <sub>200</sub> „

Wir waren bei unseren Untersuchungen, wie anfangs erwähnt, ausgegangen von dem überraschenden Antitoxinbefund in der Milch der Kuh 8246 sowie im Blute des von ihr ge-

säugten Kalbes 219. Diese Untersuchungen fanden im Juli 1908 statt. Damals erhielt aber die Mutterkuh eine erneute Injektion von 50 ccm Tetanusserum. Deshalb sei der bei diesen beiden Tieren im Oktober ermittelte Antitoxinbefund zunächst einmal von der nachfolgenden Betrachtung ausgeschlossen.

Das Gesamtergebnis bei den übrigen, künstlich niemals mit Tetanusvirus, Tetanusgift, oder Tetanusserum behandelten Rindern wäre also, daß wir in 12 der untersuchten 39 Fälle Antitoxin gefunden haben, und zwar in Mengen schwankend zwischen  $\frac{1}{2400}$ — $\frac{1}{150}$  AE pro ccm. Es ist damit meines Wissens zum erstenmal nachgewiesen worden, daß im Blute von normalen Tieren, d. h. von Tieren, die nie künstlich mit Tetanusgift oder Tetanusserum in Berührung gebracht sind, sich Tetanusantitoxin im Blute finden kann.

Höchst eigenartig stellt sich nun dieses Ergebnis, wenn wir, wie es in den letzten Tabellen geschehen ist, die Resultate bei den jungen, noch nicht 2 Jahre alten Tieren trennen von den Ergebnissen bei den älteren Tieren. Bei 17 jüngeren Tieren (No. 219 scheidet aus den eben auseinandergesetzten Gründen zunächst aus) erwies sich das Blut von 16 Tieren völlig antitoxinfrei und nur bei einem  $1\frac{1}{2}$  Monate alten Saugkalbe (221) fanden sich Spuren von Antitoxin. Dieses Kalb aber entstammte einem Muttertier (133), das sehr beträchtliche Mengen Antitoxin ( $\frac{1}{200}$  AE pro 1 ccm) aufwies. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß das Blutantitoxin dieses Kalbes zurückzuführen ist auf eine durch die Säugung erfolgte Antitoxinübertragung. Abgesehen von dieser Uebertragung durch Säugung erwies sich also das Blut der jungen, noch nicht 2-jährigen Rinder tetanusantitoxinfrei. Bei den untersuchten 22 älteren Rindern (No. 8246 scheidet zunächst aus) dagegen fanden wir in 12 Fällen, also in über der Hälfte der Fälle, Antitoxin.

Wie ist nun das Auftreten von Tetanusantitoxin im Blute älterer Rinder zu erklären?

Zunächst ist die Frage, ob hier etwa eine Besonderheit des betreffenden Rinderbestandes vorliegt. Hierfür scheint in

der Tat zunächst zu sprechen, daß die negativen Antitoxinbefunde sämtlich angekaufte Tiere betreffen. Andererseits aber sind unter diesen antitoxinfreien älteren Tieren solche, die seit langen Jahren (Rind 72 seit 8 Jahren) im Bestand sind; und weiter finden sich unter den mit Antitoxin behafteten Tieren angekaufte Tiere, die erst seit wenigen Monaten (Rind 218 3 Monate) im Bestande sind. Ich glaube also nicht, daß hier eine Besonderheit gerade dieses Rinderbestandes vorliegt, sondern daß ähnliche Verhältnisse auch bei anderswo aufgestellten Rindern sich finden werden.

Was alsdann die Rassenfrage betrifft, so glaube ich ebenfalls, daß dieselbe ohne Bedeutung ist, da es sich im vorliegenden Fall um einen bezüglich der Rassenverhältnisse außerordentlich gemischten Bestand handelt (Holländer, Ostpreußen, Vogelsberger, Simmenthaler sowie Kreuzungen). Wir finden aber, wie die Tabellen XII und XIII zeigen, Vertreter aller Rassen sowohl bei den antitoxinfreien als bei den antitoxin-behafteten Tieren.

Auf die Frage der Abstammungsverhältnisse komme ich gleich zu sprechen, wenn wir nun die Frage weiter erörtern, worauf nun der Antitoxingehalt des Blutes bei einem so beträchtlichen Prozentsatz der älteren Rinder zurückzuführen ist; ein Befund, der wohl in Parallele gesetzt werden kann mit den Ermittlungen Cobbetts (13) über Befund von Diphtherieantitoxin im Blut normaler Pferde und denen Wassermanns (14) und anderer über die gleichen Befunde im Blute normaler Menschen.

Die Antitoxine sind Reaktionsprodukte des Organismus auf die Toxine. Es ist also ganz verständlich, wenn wir Antitoxine im Blute eines Organismus finden, der auf natürlichem Wege eine toxische Erkrankung überstanden hat, oder den wir künstlich mit dem giftliefernden Virus bzw. mit dessen Gift behandelt haben. Der Befund von Antitoxin bei Individuen, bei denen eine solche künstliche Behandlung niemals stattgefunden hat und bei denen wir auch nichts von einem natürlichen Ueberstehen der Krankheit nachweisen können, war dagegen lange Zeit eine gewisse Crux der Immunitätsforschung.

Verhältnismäßig leicht verständlich wären solche Befunde nach der Ehrlichschen Seitenkettentheorie. Ehrlich stellt sich ja bekanntlich vor, daß die Giftwirkung der Toxine darauf beruht, daß mit Hilfe einer besonderen Gruppe im Toxinmolekül die Gifte sich an bestimmte Gruppen (Seitenketten, Aufnahmeapparate, Rezeptoren) des Zellprotoplasma binden und dann nach erfolgter Bindung ihre wiederum an eine besondere Gruppe geknüpfte Giftwirkung auf die Zelle ausüben. Bei nicht zu intensiver Vergiftung erfolgt dann nach den bekannten Ehrlichschen Vorstellungen die Abstoßung dieser Zellrezeptoren ins Blut, wo ihre Wirkung als Antitoxine nun ohne weiteres verständlich ist. Das Vorkommen von Antitoxin im Blutserum normaler, d. h. nicht behandelter Tiere wäre nach Ehrlich nicht weiter überraschend, wenn man sich nur weiter vorstellt, daß das betreffende Individuum eben schon einmal Stoffe aufgenommen hat, die zufällig dieselbe Affinität zu jenen Seitenketten hatten wie die Toxine. Unsere künstlichen Immunisierungsprozesse sind also nach Ehrlich gewaltsame Wiederholungen schon unter normalen Verhältnissen eintretender physiologischer Vorgänge, und die gewaltige Anhäufung der Antitoxine im Blute entspricht nur solchen Folgen cellulärer Reaktionen, die schon unter normalen Lebensbedingungen gelegentlich zu beobachten sind, durch willkürliche Immunisierungen aber brüsk gesteigert werden.

Auf unseren gegebenen Fall angewandt, müßte man sich also nach Ehrlich vorstellen, daß ein gewisser Prozentsatz der Rinder schon normalerweise diese tetanusgiftbindenden Rezeptoren überproduziert und ins Blut abstößt. Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich deshalb die Abstammungsverhältnisse der Rinder in die obigen Tabellen XII und XIII mit aufgenommen und bei meinen Ueberlegungen mit berücksichtigt. Denn man könnte wohl erwarten, daß die Neigung zur leichteren Abstoßung dieser tetanusgiftbindenden Zellrezeptoren in der Deszendenz vielleicht wiederkehrt. In der Tabelle XII finden wir nun sowohl Tiere ohne Antitoxinbefund, die von Rindern abstammen, welche Antitoxin führen, als auch Kälber ohne Antitoxinbefund, stammend von Rindern, die kein Antitoxin führen. Doch wollen diese Beobachtungen nicht viel

besagen, da nach meinen Feststellungen das Tetanusantitoxin im Blut der Rinder allgemein erst jenseits des 2. Jahres auftritt. Der korrespondierende Antitoxinbefund bei den Kälbern 221 und 219 mit den entsprechenden Muttertieren 133 und 8246 ist wohl, wie oben erwähnt, am ungezwungensten als Antitoxinübertragung durch Säugung aufzufassen. Es scheiden also diese Fälle von der Betrachtung aus. In Tabelle XIII dagegen finden wir 2 Rinder (110 und 116), wo in der Tat ihre schon über 2 Jahre alten Deszendenten (182 und 189) ebenfalls Antitoxin im Blut haben. Andererseits aber finden wir das Blut des Rindes 185 ganz beträchtlich antitoxinhaltig, wo das Blut des Muttertieres antitoxinfrei ist. Kurz, die Untersuchung der Deszendenzverhältnisse bildet nicht gerade eine Stütze für die obigen Ueberlegungen.

Weiter läge, wenn die Ehrlichsche Auffassung über die Ursache des Auftretens normaler Antitoxine auch in unserm Fall Anwendung finden müßte, nach meiner Meinung eine ganz logische Konsequenz in der Annahme, daß bei Tieren mit solchem („natürlichen“) Antitoxinbefund durch eine künstliche Immunisierung die normalerweise schon erfolgende Ueberproduktion tetanugiftbindender Rezeptoren gewaltig sich steigern lassen würde und daß man dementsprechend beim Rinde ganz besonders leicht durch eine spezifische Giftbehandlung Tetanusantitoxin im Blute anhäufen könnte; leichter jedenfalls als beim Pferde, das wir normalerweise immer frei von Tetanusantitoxin finden. Dahingehende Versuche aber haben uns gezeigt, daß beim Rinde die künstliche Erzeugung von Tetanusantitoxin, soweit wir bisher beurteilen können, sehr schwer ist, jedenfalls unverhältnismäßig schwerer als beim Pferde. Wenn auch diese Beobachtungen durchaus nicht absolut dagegen sprechen, daß die Ehrlichsche Deutung der Ursache des Auftretens von Antitoxinen im Blut normaler Tiere auch auf unsern Fall anwendbar ist, so veranlassen sie doch, an andere Möglichkeiten zu denken.

Wir müssen uns deshalb überlegen, ob nicht doch vielleicht infolge eines streng spezifischen Reizes, d. h. durch Berührung mit dem echten Tetanugift, bei jenen Kühen das Antitoxin sich gebildet hat. Der Tetanusbacillus bildet bekanntlich sehr widerstandsfähige Sporen und ist dank

dieser Widerstandsfähigkeit sehr verbreitet in der Natur, so daß man ihn mit Recht als ubiquitären Saprophyten bezeichnen kann. Der Tetanusbacillus ist weiter Anaerobier und findet sich demgemäß hauptsächlich in Medien, in denen Reduktionsprozesse stattfinden. Er findet sich daher recht häufig auf Düngerstätten, fast konstant in der Gartenerde, häufig auch in den unteren Darmpartien der Säugetiere. Es ist also schon a priori recht wahrscheinlich, daß er auch gelegentlich beim Rinde im Darm vorkommt. Eine einfache Ueberlegung ergibt, daß Kühe Tetanussporen eigentlich aufnehmen müssen. Kühe erhalten bekanntlich Rüben zur Fütterung, an denen naturgemäß immer Erde und Schmutzteile haften und ich habe in Rüben anhaftender Erde auch Tetanussporen nachweisen können. Tetanussporen gelangen also wohl sicher, wenigstens bei älteren Rindern, in den Darm und es finden sich in der Literatur bereits Angaben über den Nachweis von Tetanusvirus im Darminhalt der Tiere und speziell auch der Rinder [Sanchez-Toledo und Veillon (15), Sormani (16), Molinari (17), Hoffmann (18) u. a.]. Die zuerst genannten Autoren haben in 50 Proz. der von ihnen untersuchten Fälle im Darminhalt Tetanusvirus nachweisen können. Ich persönlich habe mich mit den obigen apriorischen Ueberlegungen und der Feststellung dieser Literaturangaben nicht begnügt, sondern Versuche in die Wege geleitet, auch im Darminhalt der von mir untersuchten Rinder auf Tetanusvirus zu fahnden. Gleich im ersten untersuchten Falle, bei Rind 218, das pro ccm Blutserum  $\frac{1}{1,000}$  AE enthielt, gelang es, das Tetanusvirus im Darminhalt nachzuweisen.

Ich kam mit folgender Methode zum Ziel: In Bouillon aufgeschwemmter Darminhalt wurde zunächst  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $75^{\circ}$  erhitzt, dann auf verflüssigtem Agar in hoher Schicht verimpft, der dann seinerseits nach erfolgter Erstarrung noch mit sterilem Olivenöl überschichtet wurde. Obwohl unter den noch sehr reichlich gewachsenen Kolonien, bestehend aus schlanken Stäbchen vom Typus des malignen Oedembacillus, keine auf Tetanus verdächtige Kolonie sich entwickelte, wurde aus dem tiefsten Teile des Agar nach 5-tägigem Wachstum ein  $\frac{1}{2}$  cm langes Stück abgeschnitten, in ein Erlenmeyersches mit 50 ccm Bouillon gefülltes Kölbchen gebracht, in dem dann die Luft durch Wasserstoff in der bekannten Weise ersetzt wurde. Das Kölbchen wurde 12 Tage bei  $37^{\circ}$  gehalten. Beim Oeffnen wurde reichliche Gasbildung nachgewiesen und es fand sich der für Tetanuskulturen so charakteristische, schwer zu beschreibende unangenehme



Geruch, so daß wir schon aus demselben die Wahrscheinlichkeitsdiagnose auf Tetanus stellen konnten. Mikroskopisch allerdings, sowohl im hängenden Tropfen als im gefärbten Präparat, fand sich in der stark getrübbten Bouillon nur das genannte schlanke Stäbchen, nicht der Tetanusbacillus<sup>1)</sup>. Mit dem durch ein kleines Bakterienfilter geschickten Filtrat des Kölbchens wurden 4 Mäuse geimpft mit folgendem Ergebnis:

Maus 6147	0,0001 ccm	subkutan	= glatt					
„ 6095	0,0005	„	„	†	nach 3 1/2	Tagen	an Tetanus	
„ 6109	0,001	„	„	†	„ 60	Stunden	„	„
„ 6157	0,0015	„	„	†	„ 48	„	„	„
„ 6155	0,002	„	„	†	„ 36	„	„	„
„ 6174	0,01	„	„	†	„ 24	„	„	„
„ 6175	0,1	„	„	†	„ 12	„	(gefunden in Tetanus-	stellung)

Das Gift wurde von Tetanusantitoxin neutralisiert. Es handelt sich also in der Tat um echtes Tetanustoxin und speziell neutralisierte das antitoxische Serum des Rindes 218, aus dessen Darm das Tetanusvirus gezüchtet war, in der Dosis von 0,01 die Giftdosis von 0,01 ccm im Mischungsversuch. — Meine Versuche werden noch fortgesetzt.

Angesichts des anscheinend häufigen Vorkommens des lebenden Tetanusvirus im Darminhalt der Rinder muß man wohl auch die Möglichkeit, daß sie gelegentlich die Darmwand passieren können, zugeben. Das frühere Dogma von der Keimdichte des Intestinums hat ja so wie so in den letzten Jahren — ich erinnere nur an die Arbeiten von Ficker (19) und Selter (20) — einen Stoß erhalten. Es ist nun weiter durch experimentelle Untersuchungen [Tarozzi (21), Soprana (22), Canfora (23)], nachgewiesen worden, daß Tetanussporen sich in den Organen sehr lange lebend erhalten, und ich kann mir daher weiter sehr gut vorstellen, daß unter geeigneten Bedingungen das Tetanusvirus sich in geringer Menge vermehren, zu einer gewissen Giftproduktion und damit auch zur Antitoxinbildung Anlaß geben kann, auch ohne daß wir klinisch etwas von einer Erkrankung erkennen. Man könnte auch, worauf Herr Professor Bonhoff gelegentlich einer Diskussion über eine vorläufige kurze Mitteilung dieser Befunde (24) hinwies, daran denken, daß im Darminhalt selbst das Tetanusvirus sich vermehrt und Gift bildet, und daß dann erst das gebildete Gift die Darmwand passiert. Allerdings

1) Inzwischen ist die Reinzüchtung des Tetanusbacillus aus diesem Fall gelungen.

hat sich bisher das Tetanusgift vom Magendarmkanal aus als unwirksam erwiesen. Es ist aber bisher noch nicht genügend untersucht, ob es nicht bei geeigneten Tieren vom Intestinaltraktus aus Antitoxinbildung auslösen kann. Die Tatsache einer Antikörperbildung bei Individuen, die klinisch nicht an der betreffenden Krankheit gelitten haben, ist uns ja längst geläufig. Wir finden Diphtherieantitoxin im Blute von mit Diphtheriebazillen behafteten Individuen, die klinisch nie eine Diphtherie überstanden haben. Wir finden in Typhus- und Cholerazeiten spezifische Antikörper gegen Typhusbazillen bzw. Cholera vibrien im Blute zahlreicher Individuen, die klinisch nie auch nur eine Spur einer Erkrankung gezeigt haben.

Mir scheint der von mir geführte Nachweis von Tetanusantitoxin im Blute älterer Kühe, die nachweisbar niemals an Tetanus gelitten haben, sich noch am allerungezwungensten dadurch zu erklären, daß diese Tiere unter dem Reiz des spezifischen Tetanusgiftes ihr Antitoxin gebildet haben. Hierfür spricht mir — um noch einmal kurz zusammenzufassen — die weite Verbreitung des Tetanusvirus in der Natur, der von mir und anderen Autoren erhobene Befund von Tetanusvirus im Darminhalt der Kühe, speziell der von mir gebrachte Nachweis des Tetanusvirus im Kot einer antitoxisches Blut besitzenden Kuh, sodann die lange Haltbarkeit der Tetanussporen im Organismus, sowie vor allem die Tatsache, daß sich in meinen Untersuchungen das Antitoxin fast nur bei älteren Tieren fand und nicht bei den jüngeren in der Hauptsache auf Milchnahrung angewiesenen Kälbern, bei denen die Aufnahme tetanusvirushaltiger Nahrung nicht so die Regel sein dürfte, wie bei jenen.

Weiter möchte ich darauf hinweisen, daß der Tetanus beim Rinde anscheinend eine ziemlich seltene Erkrankung ist [Eberhard (25)], obwohl an sich kaum einzusehen ist, warum das Rind weniger Gelegenheit haben sollte, sich mit Tetanusvirus zu infizieren, als das Pferd. Es wäre wohl denkbar, daß dieses geringere Befallensein der Rinder von Tetanus sich mit dem Antitoxingehalt des Blutes in Zusammenhang bringen läßt, den wir normalerweise bei einem großen Prozentsatz der älteren Tiere finden. Möglich aber auch, daß das Rind eine

geringere Tetanusgiftempfindlichkeit besitzt, worüber aber noch keine genügenden Erfahrungen vorliegen. Sollte das Vorhandensein des Blutantitoxins bei älteren Rindern ihre relative epizootische Tetanusimmunität bedingen, dann wäre diese natürlich erworbene Tetanusimmunität der Rinder ein weiteres Beispiel dafür, daß nicht jede Infektion mit krankheitszeugendem Virus einen Schaden für das betreffende Individuum bedeutet.

Für die experimentelle Technik endlich lehren meine Untersuchungen, daß man sich nicht mehr wie bisher darauf verlassen darf, das Blut normaler Tiere frei von Tetanusantitoxin zu finden, und speziell bei Rinderversuchen sind vorherige Kontrollprüfungen künftighin unerlässlich.

#### Zusammenfassung.

1) Das Blut junger, noch nicht 2-jähriger Rinder ist in der Regel frei von Tetanusantitoxin und wo wir Antitoxin finden, dürfte es meistens auf einer Uebertragung durch die Milch der antitoxisches Blut besitzenden Mutterkuh oder Amme beruhen.

2) Im Blute älterer Rinder finden wir in einem großen Prozentsatz Tetanusantitoxin. Diese Feststellung beseitigt den bisherigen Glauben, daß normale Tiere stets frei von Tetanusantitoxin seien.

3) Worauf dieses Auftreten von Tetanusantitoxin zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben. Der Nachweis von Tetanusvirus im Darminhalt der Kühe läßt aber an eine Antitoxinbildung unter dem Reiz des in die Organe eingewanderten Tetanusvirus bzw. des von ihm gebildeten Giftes denken.

#### Literatur.

- 1) Römer und Much, Antitoxin und Eiweiß. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 63, Heft 6.
- 2) Dieselben, Ueber intestinale Antitoxinresorption. Gesellsch. z. Beförd. d. ges. Naturwissensch. Marburg, 1906, No. 5.
- 3) Dieselben, Ueber intestinale Eiweißresorption. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 64, Heft 2.

- 4) Römer, Experimenteller Beitrag zur Bewertung der natürlichen Säuglingsernährung. Sitz.-Ber. d. Gesellsch. z. Beförd. d. ges. Naturwissensch. Marburg, 1908, No. 6.
- 5) Hamburger, Ueber Eiweißresorption bei der Ernährung. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 65.
- 6) v. Behring, Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten. Berlin und Wien, Urban und Schwarzenberg, 1900.
- 7) Ransom, The conditions which influence the duration of passive immunity. The Journ. of Path. and Bact., 1899.
- 8) Wassermann, Ueber eine neue Art von künstlicher Immunität. Berl. klin. Wochenschr., 1898, 1.
- 9) Metschnikoff, Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. Annales de l'Institut Pasteur, 1904, 2.
- 10) Marie, Recherches sur les propriétés antitétaniques des centres nerveux de l'animal sain. Annales de l'Institut Pasteur, 1904.
- 11) Assacawa, Die Basis der natürlichen Immunität des Huhnes gegen Tetanus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 24.
- 12) Wolff-Eisner, Die Bindungsverhältnisse der Organgewebe gegenüber Toxin und ihre klinische Bedeutung für Inkubation und natürliche Immunität. Centralbl. f. Bakt., Bd. 47.
- 13) Cobbett, The origin of antitoxin is it present in the blood of some normal animals. Ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. 26.
- 14) Wassermann, Ueber die persönliche Disposition und Prophylaxe gegenüber Diphtherie. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 15.
- 15) Sanchez-Toledo und Veillon, zitiert nach v. Lingelsheim, Handb. der pathog. Mikroorganismen, Artikel Tetanus.
- 16) Sormani, zitiert nach Hoffmann.
- 17) Molinari, zitiert nach Hoffmann.
- 18) Hoffmann, Ueber das Vorkommen des Tetanuserregers in den Faeces von Tieren. Hyg. Rundsch., 1905, 24.
- 19) Ficker, Ueber die Keimdichte der normalen Schleimhaut des Intestinaltrakts. Arch. f. Hyg., Bd. 52.
- 20) Selter, Bakterien im gesunden Körpergewebe und deren Eintrittspforte. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 54.
- 21) Tarozi, Ueber das Latentbleiben der Tetanussporen im tierischen Organismus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 40.
- 22) Soprana, Ueber im Körper latente Bakterien und die Möglichkeit ihrer Verbreitung im Organismus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 41.
- 23) Canfora, Ueber die Latenz der Tetanussporen im tierischen Organismus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, Orig.
- 24) Römer, Normale Antitoxine. Sitz.-Ber. d. Gesellsch. z. Beförd. d. ges. Naturwissensch. Marburg, 1908, No. 8.
- 25) Eberhard, Tetanus beim Kalbe. Berl. tierärztl. Wochenschr., 1905, 12.

[From the Danish State Serum Institute.]

**Spontaneous Agglutination of Horse Erythrocytes  
suspended in Sodium Chloride Solution.**

**A Contribution to the Haemolytic Technique.**

By **E. E. Atkins,**

Fishmongers' Company's Research Scholar.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Jan. 1909.)

During the performance of some haemolytic experiments, I was, at the outset, troubled by spontaneous agglutination and subsequent haemolysis in the control tubes which it is customary to set up in such experiments. These control tubes contained a 1 % suspension of washed horse erythrocytes in 0.9 % sodium chloride solution in distilled water. It is noteworthy that no agglutination was present in the other tubes. For example in a series for the determination of the haemolytic power of vibriolysin, the presence of a very small amount of the latter sufficed to inhibit agglutination, although this amount of lysin produced little or no haemolysis. This phenomenon had been observed from time to time in this Laboratory, and as it seemed likely that it would vitiate the results of haemolytic tests, it was deemed necessary to institute an enquiry into its cause.

Prima facie, it seemed probable either that it was due to a peculiar characteristic of the blood employed, or that some error of technique had crept in.

The blood was taken in the usual way with a canula from the jugular vein of the horse, and the coagulum removed by agitation with a piece of iron wire. The corpuscles were allowed to sediment, and then separated from the serum with a pipette, and twice washed with 3 or 4 volumes of 0.9 % sodium chloride solution with the aid of the centrifuge. One cubic centimeter of the centrifugalised corpuscles was added to 99 c. c. of salt solution and thoroughly mixed. Into a test tube which already contained 2 c. c. of salt solution, 8 c. c. of this suspension was measured with a syringe. With this instrument it is possible to project the erythrocytic suspension in a forcible stream, and so ensure immediate mixing. The tube was then shaken and placed in a water-bath at

37° C for 3 hours. At the end of this period there was usually well marked agglutination, the corpuscles having settled in more or less discrete masses on the bottom and sides of the tube. Often by this time the body of the fluid had quite cleared and there was usually no haemolysis. The tube was now shaken again, thereby disrupting the masses of corpuscles, and deposited in the cold-room overnight (average temperature 6° C). Next morning haemolysis which was very inconstant in amount — varying from slight to complete — was observed to have ensued.

The horses possessed by the Institute have for the most part been used for the production of diphtheria antitoxin. The blood of 4 such horses was tested, and all were subject to the same spontaneous agglutination. Next some blood from a normal horse was obtained and acted in precisely the same manner. Afterwards guinea-pig, rabbit, goat, sheep, ox, and swine corpuscles were also found, *ceteris paribus*, to be agglutinated. Then the idea that the origin of the phenomenon was some specific quality of the horse blood used was abandoned, and attention was directed to detecting some fault in the technique.

a) Was it due to the test tubes used?

This could not be so for the corpuscles agglutinated in the porcelain dish from which they were transferred to the test tubes, and new Jena glass tubes had the same effect.

b) Was it the sodium chloride?

No. Pure crystallized NaCl from another source was used. In addition the corpuscles were washed and suspended in concentrations of NaCl varying from 0,7 % to 1,2 %. In addition isotonic sodium sulphate was used in place of sodium chloride. The results were identical.

c) Was it the distilled water used for making the salt solution?

By freshly distilling some water this possibility was eliminated.

As before mentioned even a trace of vibriolysin inhibits agglutination, — a quantity which produces little or no haemolysis. This led to an investigation of what substances would act likewise. Table I records a qualitative examin-

Table I.

Each tube contained 10 c. c. of 1% horse erythrocytes suspended in 0.9% sodium chloride solution. Incubated for 3 hours at 37° C.

Reagent	c. c.	Agglutination
Bouillon	0,01	0
Pepton (1% solution)	0,01	0
Fat-free pepton (1% solution)	0,01	0
Gelatin (weak solution)	0,5	0
	0,01	+
Serum (of horse supplying the erythrocytes)	0,01	0
Sodium citrate (1%)	0,01	0
Potassium oxalate (neutral 1%)	0,1	0
Potassium sodium tartrate (1%)	0,5	+
Potassium hydrogen phosphate [K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ] (1%)	0,5	+
Magnesium sulphate (1%)	0,5	+
Maltose (1%)	0,5	+
Saccharose (1%)	0,5	+

ation of various bodies. It will be seen that the substances capable of bringing about an inhibition such as bouillon and pepton, are of a proteid nature, save the two salts sodium citrate and potassium oxalate. It is interesting to note that these two salts also prevent clotting of blood and milk, so they seem to have a considerable influence on coagulation processes in general.

The blood suspension agglutinates with rapidity in the dish from which it is transferred to the tubes, at room temperature. The clumps can be disintegrated by vigorous shaking, but the erythrocytes reagglutinate. If however a little horse serum is added before shaking, the phenomenon is inhibited.

It was noted that large clumps, equal in magnitude to a pin's head, form in connexion with the air-bubbles which frequently make their appearance on the sides of the tubes during incubation. Tapping dislodges the air-bubbles and the clumps fall speedily to the bottom of the tube.

It was now interesting to define the minimal quantity of these inhibiting agents which would be effective. From table II it will be seen that the requisite amount of bouillon differs only slightly from that of pepton (Witte), and the quantity of horse serum is about the same. Thus 0,005 c. c. of bouillon just prevented agglutination, and 0,0065 c. c. in the case of pepton. The bouillon used contained just 1% pepton, so one would expect that this was the active constituent. Bouillon

Table II.

c. c.	Bouillon		Pepton 1 %		Horse serum	
	Agglu- tination	Haemo- lysis	Agglu- tination	Haemo- lysis	Agglu- tination	Haemo- lysis
0,02	Nil	Nil	Nil	Faint trace	Nil	Nil
0,016	"	"	"	Trace	"	"
0,013	"	"	"	Trace	"	Trace
0,01	"	"	"		"	Nil
0,008	"	"	"		"	Trace
0,0065	"	Faint trace	"		"	Trace
0,005	"	Trace	+		+	
0,004	+		+		+	
0,0035	+		+		+	
0,003	+		+		+	

Agglutination was estimated at the end of 3 hours incubation at 37°, the tubes not having been disturbed in the meanwhile. They were shaken and examined for haemolysis next morning.

The sign  $\wedge$  indicates increasing haemolysis, although not always uniform.

made without the addition of pepton has an inhibiting effect, but only in much larger doses, due doubtless to proteids (from the minced meat used in its preparation) which are not coagulated by heat. Other experiments indicate that very nearly the same quantities of bouillon and serum suffice to inhibit the phenomenon.

It was invariably found that haemolysis first made its appearance in a tube containing more of the substance than was necessary to just inhibit agglutination. Referring again to table II, the tube showing the first sign of agglutination contained 0,004 c. c. of bouillon; but haemolysis first appeared in a tube containing 0,0065 c. c. bouillon. This is probably due to a small amount of agglutination having occurred in these tubes, which remained undetected. It would be quite easy for a few clumps, which formed early, to fall to the bottom, and become covered by the remainder of the sedimented corpuscles.

Taking into consideration these experiments, one was gradually lead to the opinion that the agglutination was a phenomenon dependent upon the excessive removal of serum from the cells, and their subsequent exposure to



an environment quite alien from their natural one, — to wit, sodium chloride solution. The fact that all the different kinds of blood examined are subject to it, argues much in favour of this hypothesis. The final dilution of the serum adhering to the corpuscles must indeed be very great after twice washing them with about 4 volumes of 0.9 % salt solution, and suspending them in the latter, in a 1 % concentration. Under these conditions the corpuscles are in a state of very unstable equilibrium. Gengou (1) has described some experiments in which he found that the red cells of rabbit, ox, and dog, when washed free from serum were agglutinated in the presence of fine suspensions of inert precipitates such as  $\text{BaSO}_4$  and  $\text{CaF}_2$  in isotonic  $\text{NaCl}$  solution. Serum, added in small amounts, prevented it, and moreover sodium citrate also. It seems that there is a difference only of degree in these experiments of Gengou and my own, in that the particles of  $\text{BaSO}_4$  increase the tendency of the corpuscles to agglutinate, by forming nuclei for the process to start. In my experiments, the susceptibility of the erythrocytes to agglutinate around the air-bubbles, which was mentioned above, can doubtless find a similar explanation. One is naturally struck with the analogy of this process to that of the crystallisation of supersaturated solutions in chemistry, where a foreign particle, or a small crystal will start the process.

Some experiments were now undertaken to see to what extent the corpuscles could be washed with safety, and also to see whether the different concentrations in the final suspensions were significant. The red cells were washed with accurately measured quantities of salt solution and after being centrifuged, as much as possible of the latter was separated from them. Agglutination was examined for next day, as in the tubes containing 5 % suspensions, it was difficult to see the agglutinated cells before the rest of the corpuscles had sedimented. It will be seen from table III that there was no agglutination in any of the suspensions of erythrocytes after once washing. After twice washing the 1 % and 2 % suspensions were agglutinated, but not the 5 %; and after thrice washing the 5 % was the only one not agglutinated.

Table III.

## Horse erythrocytes.

Each washing consisted of the mixture of 1 volume of sedimented corpuscles with 2 vols. of salt solution.

## Washed once.

Concentration of red cell suspension	Agglutination
1 ‰	0
2 ‰	0
5 ‰	0

## Washed twice.

1 ‰	+
2 ‰	+
5 ‰	0

## Washed thrice.

1 ‰	+
2 ‰	+
5 ‰	0

An experiment was now undertaken in which the corpuscles were washed once only with 9 vols. of salt solution (table IV). The 1 ‰, 1.5 ‰, 2 ‰ and 3 ‰ were all agglutinated but the 4 ‰ and 5 ‰ were not. In the 2 last suspensions the serum had not attained a sufficient dilution for agglutination to take place.

Table IV.


## Horse erythrocytes.

Sedimented corpuscles washed only once with 9 vols. of salt solution.


Concentration of red cell suspension	Agglutination
1 ‰	+
1.5 ‰	+
2 ‰	+
3 ‰	+
4 ‰	0
5 ‰	0

Table V is a comparison of the inhibiting effect of vibriolysin and sodium citrate. In the case of vibriolysin 0.008 c. c. just prevents agglutination. This agrees very well with the analogous amount of bouillon. When one inspects the haemolysis it is seen that in the first tubes there is a decreasing amount of laking due to the action of the lysin; then a zone with little or none, followed by an increasing haemolysis in the last of the series corresponding to the agglutination in

Table V.  
Vibriolysin.

	c. c.	Agglutination (after 3 hours incubation)	Haemolysis	
1.	0,05	Nil	Slight	} Action of lysin
2.	0,03	"	Trace	
3.	0,025	"	Nil	
4.	0,02	"	Faint trace	
5.	0,016	"	Nil	} Lysis due to agglutination
6.	0,013	"	Faint trace	
7.	0,01	"	Trace	
8.	0,008	"	"	
9.	0,006	+	Slight	}
10.	0,005	+		
11.	0,004	+		
12.	0,003	+		
13.	0,002	+		

Sodium citrate 1%.

		Agglutination	
1.	0,01	Nil	Nil
2.	0,008	"	"
3.	0,0065	"	Faint trace
4.	0,005	"	" "
5.	0,004	+	
6.	0,0035	+	
7.	0,003	+	
8.	0,0025	+	
9.	0,002	+	
10.	0,0015	+	
11.	0,001	+	

these tubes. For sodium citrate 0,005 c. c. of a 1% solution in 0,9% sodium chloride solution just prevents agglutination.

It will be well now to survey the practical application of these facts. In the first place, in a series dealing with the estimation of the strength of a haemolysin or its antibody, tubes containing only salt solution and erythrocytes are not controls at all. For instead of a single factor having been changed e. g. the exclusion of lysin from the control, the mutual compatibility of the corpuscles with their substratum has become disturbed. It is customary in this Institute when estimating the strength of a haemolysin, to take a tube which contains about 30% haemolysis, and measure the exact amount according to the colorimetric method described by Madsen, as in this way a more accurate result is obtained. When a slight amount of haemolysis, — say 1 or 2% — has occurred in the control tubes, one has been tempted to subtract this amount from the reading of the chosen tube

under the assumption that the defect ran uniformly through the series. From what has been set down above, this is a fallacy, and one must either disregard such controls or add some inhibiting agent such as bouillon or serum.

Horse serum is replete with multifarious substances, such as complements and antibodies etc., and in immunity experiments it may be absolutely essential to get rid of these bodies by thorough washing. It will be necessary therefore in such cases to add some inhibiting substance to avoid agglutination, and one would naturally first turn to pepton or bouillon. But we know from some experiments of Madsen and Walbum (2) that pepton exerts a modifying action upon tetanolysin and is therefore not an innocuous body. As far as can be seen at present one is justified in employing sodium citrate in small amounts for this purpose, though further research may prove that this substance in certain cases is not without deleterious effect. It will be most expedient to incorporate it in the whole red cell suspension, as otherwise agglutination very quickly ensues in the receptacle from which it is measured, and owing to rapid sedimentation all the tubes in a long series will not get an even quantum of erythrocytes. I have latterly been adding sodium citrate to the erythrocytic suspensions with perfect success. In every 100 c. c. of suspension is incorporated 0,2 c. c. of a 1 % solution of sodium citrate in 0,9 % sodium chloride solution. This corresponds to a 0,002 % suspension of sodium citrate in the blood suspension. This small amount of the salt ensures an even distribution of the erythrocytes, and the controls are always quite free from haemolysis.

To Dr. Madsen I am much indebted for his supervision of this work.

#### References.

- 1) Gengou, Compt. rend., T. 138, p. 926.
- 2) Madsen and Walbum, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1906, Heft 3.

#### Zusammenfassung.

1) Werden Pferdeblutkörper zweimal mit 0,9-proz. NaCl gründlich ausgewaschen und dann in 0,9-proz. NaCl zu 1 Proz. aufgeschwemmt, so wird häufig schnelle spontane Agglutination beobachtet. Werden die Röhrchen dann geschüttelt, so tritt

Hämolyse ein. Dasselbe Phänomen wird bei Meerschweinchen-, Kaninchen-, Schaf-, Ziegen- und Schweine-Erythrocyten beobachtet.

2) Diese Agglutination wird durch Zusatz von kleinen Mengen von Serum, Bouillon, Pepton, Kalium-Oxalat und durch Natrium-Citrat verhindert.

3) Diese Agglutination ist wahrscheinlich durch die exzessive Wegnahme des Serums von den Blutkörperchen bedingt, wodurch ihr Gleichgewichtszustand geändert wird. Die Agglutination tritt besonders um Fremdkörperchen, wie z. B. Luftblasen u. dgl., an den Röhrchenwänden hervor.

4) Wenn es von Wichtigkeit ist, so viel Serum wie möglich (z. B. bei Pferdeblut mit seinem großen Gehalt an Komplementen, Antikörpern etc.) von den Blutkörperchen zu entfernen, muß man, um Agglutination zu verhindern, einen möglichst indifferenten Körper zufügen.

5) Für eine größere Anzahl Versuche ist Natrium-Citrat hierfür gut geeignet. Durch einen Zusatz von 0,2 ccm von einer 1-proz. Natrium-Citrat-Lösung auf 100 ccm 1-proz. Blutkörperchen wird die Agglutination ganz verhindert.

---

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. u. k. Militär-sanitätskomitees in Wien; Vorst.: Doz. Dr. R. Doerr.]

### Ueber entgiftende Eigenschaften der Seife.

Von H. Raubitschek und V. K. Russ.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. Jan. 1909.)

Im folgenden wollen wir eine Reihe von Versuchen mitteilen, aus denen hervorgeht, daß Seifenemulsionen neben ihren bekannten und gut studierten hämolytischen und bakteriziden Eigenschaften auch eine entgiftende Wirkung auf gewisse Bakterientoxine zukommt.

Es gelingt, wie aus nachstehenden Versuchsprotokollen hervorgeht, durch Aufschwemmungen von Natrium oleinicum<sup>1)</sup> in Aqua destillata bedeutende Mengen von Diphtherie- oder Tetanustoxin unwirksam zu machen, wenn man Seife und Toxinlösung entsprechend lange Zeit aufeinander einwirken läßt.

1) Es empfiehlt sich, dieselbe immer frisch herzustellen.

## Versuch I.

Diphtherietrockentoxin (Ammonfällung) wird in phys. NaCl gelöst; Einwirkung zwischen Diphtherietoxin und Seife 18 Std. Zimmertemperatur. Geprüft an Meerschweinchen (subkutan).

Material	Menge des injizierten Gemisches	Gewicht des Tieres	Resultat
2,5 ccm Diphtherietrockentoxinlösung + 2,5 ccm physiol. NaCl	0,5	300	† nach 24 Std. (typischer Sektionsbefund)
	0,1	290	† nach 48 Std. (typischer Sektionsbefund)
	0,01	285	nach 24 Std. starkes Infiltr., † nach 60 Std. (typischer Sektionsbefund)
2,5 ccm Diphtherietrockentoxinlösung + 2,5 ccm Natr. olein. 0,5-proz.	2,0	290	Spur Infiltration, überlebt
	1,0	280	Strang., überlebt
	0,5	285	θ
2,5 ccm Natr. olein. 0,5-proz. + 2,5 ccm physiol. NaCl	1,0	215	θ überlebt

## Versuch II.

Eine Auflösung von Tetanustrockentoxin (Ammonsulfatfällung) in phys. NaCl wird zu 2,0 ccm in Röhrchen verfüllt und einerseits mit derselben Menge NaCl, andererseits mit Natrium oleicum 0,5-proz. vermengt; die Gemische bleiben 18 Std. bei Zimmertemperatur stehen und werden dann an weißen Mäusen (mit intramuskulärer Injektion in den rechten Hinterfuß) auf ihre Giftigkeit ausgewertet. Die Beobachtungsdauer der Versuchstiere erstreckte sich über 10 Tage. Versuch vom 4. Juli 1908.

Material	Menge des injizierten Gemisches	Resultat
2,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung + 2,0 ccm physiolog. NaCl-Lösung	0,5	5. VII. starker lok. Tetan., 6. VII. †
	0,1	5. VII. starker lok. Tetan., 6. VII. †
	0,05	5. VII. leicht. lok. Tetan., 6. VII. schwerer Tetan., 8. VII. †
	0,01	5. VII. θ, 6. VII. leicht. Tetan., 8. VII. idem, 15. VII. idem, überlebt
	0,005	5. VII. θ, 6. VII. lok. Tetan., 8. VII. idem, 15. VII. idem, überlebt
	0,001	5. VII. θ, überlebt ohne Erscheinung
2,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung + 2,0 ccm Natr. olein. 0,5-proz.	0,5	überlebt ohne Erscheinungen
	0,1	dgl.
	0,05	dgl.
	0,01	dgl.
	0,005	dgl.
	0,001	dgl.
Natrium olein. 0,5-proz.	1,0	dgl.

Was die Ursache dieser Erscheinung anlangt, so könnte man daran denken, daß der Effekt — da Seife in wässriger Lösung zum Teil hydrolytisch gespalten ist — auf die eventuell vorhandene freie Fettsäure zu beziehen wäre. Aehnliche entgiftende Wirkungen von Stearinsäure und Palmitinsäure auf Tetanustoxin sind schon von Landsteiner und Botteri<sup>1)</sup> zuerst beobachtet worden. Parallelversuche zeigten jedoch, daß freie Oelsäure bedeutend schwächer Toxinlösungen entgiftet, als Emulsionen ihres Natriumsalzes.

## Versuch III (21. Nov. 1908).

Eine Lösung von Tetanustrockentoxin in physiol. NaCl wird mit entsprechenden Mengen von NaCl, resp. Natrium oleicum 1-proz., resp. Acidum oleicum 0,5-proz. gemischt, die Proben 18 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann wie oben an weißen Mäusen ausgewertet. Die Beobachtungszeit erstreckte sich über 10 Tage.

Material	Menge des injizierten Gemisches	Resultat
2,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung	0,05	22. XI. lok. Tetan., 23. XI. schwerer Tetan., 24. XI. †
+ 2,0 ccm physiol. NaCl	0,01	22. XI. lok. Tetan., 24. XI. schwerer Tetan., 27. XI. †
	0,005	22. XI. †, 24. XI. lok. Tetan., überlebt
2,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung	0,05	überlebt ohne Erscheinungen
+ 1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	0,01	dgl.
+ 1,0 ccm physiol. NaCl	0,005	dgl.
2,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung	0,05	22. XI. lok. Tetan., 23. XI. †
+ 1,0 ccm Acid. olein. 0,5-proz.	0,01	22. XI. †, 23. XI. lok. Tetan., 25. XI. schwerer Tetan., 28. XI. †
+ 1,0 ccm physiol. NaCl	0,005	überlebt ohne Erscheinungen
1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	1,0	überlebt ohne Erscheinungen
+ 3,0 ccm physiol. NaCl		
1,0 ccm Acid. olein. 1-proz.	1,0	dgl.
+ 3,0 ccm physiol. NaCl		

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, S. 562.

Es wäre deshalb daran zu denken, ob nicht die indissoziierten Seifenteilchen als solche die Entgiftung bewirken.

Die stark entgiftende Wirkung einer Seifenemulsion im Gegensatz zu anderen Lipoiden, wie Protagon, Cholestearin oder Stearinsäure, Palmitinsäure, Tristearin usw.<sup>1)</sup>, erscheint uns *ceteris paribus* in der außerordentlichen Kleinheit und der deshalb enorm großen Oberfläche der adsorbierenden Teilchen einer Seifenemulsion begründet, da wir uns ja zweifellos vorstellen müssen, daß die Adsorptionsaffinität als solche ein Vorgang ist, der von der Oberflächengröße des Adsorbens in weitem Maße abhängig ist<sup>2)</sup>.

Jedenfalls glauben wir, daß man es hier mit einem Phänomen zu tun hat, das in der hohen Affinität mancher Antigene zu fettartigen Substanzen begründet ist. Speziell für das Tetanustoxin konnten Landsteiner und Botteri (l. c.) schon vor längerer Zeit zeigen, daß die von Wassermann und Takaki<sup>3)</sup> gefundene entgiftende Eigenschaft des Gehirnes gegenüber Tetanustoxin auf der hohen Affinität dieses Giftes zu Lipoiden, speziell zu den als „Protagon“ bezeichneten Gehirnlipoiden beruht.

Uebrigens konnte erst kürzlich der Nachweis geführt werden<sup>4)</sup>, daß gewisse Antigene zu verschiedenen relativ einfachen chemischen Bestandteilen der Gewebe Affinitäten besitzen, und es ist kaum zu bezweifeln, daß diese Affinitäten und die Verbindungsfähigkeit der Toxine mit den Zellen in kausaler Beziehung stehen. Speziell bei den Neurotoxinen und Hämolysinen scheint eine relativ hohe Affinität zu Lipoiden ziemlich allgemein zu sein, so daß die schon früher aufgestellten Hypothesen<sup>5)</sup>, daß die Toxinwirkung auf einer Zerstörung normaler Eiweiß-Lipoidverbindungen beruhe, an Wahrscheinlichkeit gewonnen hat. Desgleichen findet die Anschauung, daß der Lipoidgehalt der empfindlichen Zellen

1) Vergl. z. B. Landsteiner und Raubitschek, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 15, H. 1.

2) Ueber die Natur dieser Vorgänge vergl. Landsteiner, *Zeitschr. f. Kolloidchemie*, Bd. 3, Heft 5.

3) *Berliner klin. Wochenschr.*, 1898, No. 1.

4) Landsteiner und Raubitschek, l. c.

5) Vergl. Landsteiner und Botteri, l. c.



für die Toxinbindung eine ähnliche Bedeutung haben könnte, wie nach den Theorien von Overton und Meyer für die Wirkung gewisser Narkotika, neue Stützen.

Auch das differente Verhalten anderer untersuchter Antigene zu Seifen kann nicht besonders auffallen, da sich in den früher zitierten Arbeiten vielfach verschiedene Beziehungen der einzelnen Antigene zu bestimmten adsorbierenden Substanzen bemerken ließen.

Die schon länger bekannten Affinitäten der Haemagglutinine besonders zu Eiweißkörpern erklären die Tatsache, daß Natrium oleicum z. B. auf Ricinagglutinin keinen Einfluß auszuüben vermag, wie der nachfolgende Versuch zeigt:

#### Versuch IV.

Ricinlösung wird mit Natrium oleicum 1-proz. resp. physiologischer Kochsalzlösung vermengt. Die Proben verbleiben 24 Std. bei Zimmertemperatur und werden dann mit 0,5 ccm einer 5-proz. Kaninchenblutaufschwemmung auf ihren Agglutiningehalt geprüft. Das Resultat wird nach 2 Std. bei 37° abgelesen.

Material	Resultate in der Verdünnung des Gemisches von							
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000
1,0 ccm Ricin + 1,0 ccm NaCl	sehr stark	sehr stark	sehr stark	stark	stark	stark	deutlich	Spur
1,0 ccm Ricin + 1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.)	sehr stark	sehr stark	sehr stark	stark	stark	stark	deutlich	Spur
1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.) + 1 ccm NaCl	ø							

Ebenso gelingt es auch nicht, die Giftigkeit des Ricins für Tiere durch die Einwirkung von Seife in irgendeiner Weise abzuschwächen (siehe Versuch V).

Auffälliger erscheinen die Verhältnisse beim Arachnolysin, vielleicht auch bei den akut wirkenden Toxinen der El Tor-Vibrionen und der Staphylokokken <sup>1)</sup> (Stamm „Wirksam“). Bei allen diesen Giften, die ja eine stark blutkörperchenlösende

1) Kraus und Pribram, Wiener klin. Wochenschr., 1906.

## Versuch V.

Ricinlösung wird 1:50 mit NaCl verdünnt, davon je 2 ccm mit derselben Menge NaCl resp. Natrium oleicum 1-proz. versetzt. Nach 24-stündiger Bindungszeit bei Zimmertemperatur werden die Gemenge subkutan an weißen Mäusen ausgewertet.

Material	Dosis des Gemisches	Resultat
2,0 ccm $\frac{1}{50}$ Ricin	1,0	+ innerhalb 24 Std.
+ 2,0 ccm NaCl	0,5 0,1	dgl. dgl.
2,0 ccm $\frac{1}{50}$ Ricin	1,0	dgl.
+ 2,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	0,5 0,1	dgl. dgl.
2,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	1,0	überlebt
+ 2,0 ccm NaCl		

Wirkung besitzen, gelingt es, wie Bechhold<sup>1)</sup>, Belonowsky<sup>2)</sup> und in letzter Zeit Landsteiner und Raubitschek<sup>3)</sup> zeigen konnten, die Hämolyse durch Zusatz von Lipoiden (Protagon, Cholestearin) und durch Fettsäuren (Palmitin- und Stearinsäure) zu hemmen. Interessant ist daher, daß das Arachnolysin, trotz der starken Affinität seiner hämolytischen Komponente zu den genannten Substanzen, hinsichtlich seiner toxischen Eigenschaften für Tiere durch Seife auch nach 24-stündiger Bindungszeit in vitro keinerlei Abschwächung erfährt.

## Versuch VI.

Gemenge von gleichen Teilen Arachnolysin mit physiologischer Kochsalzlösung resp. Natrium oleicum 1-proz. bleiben 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen und werden dann peritoneal an Mäusen ausgewertet.

Material	Dosis des Gemisches	Resultat
2,0 ccm Arachnolysin	1,0	+ nach 20 Min.
+ 2,0 ccm NaCl	0,5	+ „ 45 „
2,0 ccm Arachnolysin	1,0	+ „ 23 „
+ 2,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	0,5	+ „ 42 „
2,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	1,0	nach 24 Std. krank,
+ 2,0 ccm NaCl		+ nach 48 Std.

1) Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. 60, S. 257.

2) Biochem. Zeitschr., Bd. 5, S. 65.

3) l. c.

Aehnliche Verhältnisse konnten wir beim akuten Staphylokokkentoxin konstatieren, dessen hämolytische Kraft durch Acidum stearicum, Acidum oleicum, Cholestearin, Tristearin, Tripalmitin und Protagon stark beeinträchtigt wird (vergl. übrigens Landsteiner und Raubitschek), während die akut toxische Wirkung bei intravenöser Injektion von Kaninchen durch das Zusammensein mit den genannten Substanzen keine nennenswerte Verminderung erfährt.

Es wäre demnach anzunehmen, daß die toxischen und hämolytischen Eigenschaften des Arachnolysins, des akuten Toxins der El Tor-Vibrionen und bestimmter Staphylokokkenstämme durch zwei Antigene bedingt sind, die durch ihre verschiedenen Adsorptionsaffinitäten zu den erwähnten Fetten und Lipoiden zu trennen wären <sup>1)</sup>.

Zu einer analogen Auffassung kam unter anderem auch Belonowsky (l. c.) auf Grund von zahlreichen Versuchen mit Spinnengift, die er mit einer von der unseren völlig verschiedenen Methodik durchführte. Er konnte beobachten, daß die Giftigkeit der Arachnolysinlösungen im Tierkörper auch nach Aufhebung der hämolytischen Wirkung durch Behandlung mit Blutkörperchen oder Organextrakten vollkommen erhalten bleibt. Auch wiederholtes Gefrieren und Auftauen des Arachnolysins kann die hämolytische Wirksamkeit aufheben, während die Toxizität erhalten bleibt. Belonowsky kam deshalb zu dem Schlusse, im Arachnolysin neben dem Hämolysin noch ein Toxin anzunehmen, welches den Tod der Versuchstiere (Mäuse) hervorruft.

Auch beim akuten Toxin der El Tor-Vibrionen resp. des V. Nasik hat man es nach Rothbergers <sup>2)</sup> Untersuchungen nicht mit der Wirkung seiner hämolytischen Komponente zu tun.

Stehen also die Ergebnisse der Untersuchungen von Belonowsky, Rothberger u. a. mit den Resultaten unserer Arbeit, d. h. mit den mangelnden Affinitäten der akuten Toxine zu Lipoiden und Seifen in bestem Einklang, so

1) Wir behalten uns vor, über diese Frage später ausführlich zu berichten.

2) Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, Orig., 1905; Zeitschr. f. exper. Pathol., Bd. 4, 1907.

kann es andererseits nicht auffällig erscheinen, wenn andere Bakterientoxine (Diphtherie, Tetanus), die durch Gehirn resp. lipoide Stoffe stark gebunden werden können, auch durch Seifenemulsionen entgiftet werden.

Die starken Bindungsaffinitäten zu Gehirn waren für das Tetanustoxin längst bekannt, und beim Diphtherietoxin konnten ähnliche Verhältnisse jüngst Wolff-Eisner<sup>1)</sup> und Landsteiner und Raubitschek (l. c.) feststellen.

Die von Noguchi<sup>2)</sup>, v. Liebermann<sup>3)</sup>, Landsteiner und Ehrlich<sup>4)</sup>, Landsteiner und Raubitschek<sup>5)</sup>, Raubitschek<sup>6)</sup>, Friedemann und Sachs<sup>7)</sup> und Anderen beschriebene Erscheinung, daß die hämolytische Wirkung der Seifen resp. gewisser Lipoide durch Zusatz entsprechender Mengen Serums normaler Tiere gehemmt wird, mußte uns die Frage nahelegen, ob Serum nicht auch bei der toxin-entgiftenden Eigenschaft der Seifen eine ähnliche Rolle spielen kann.

Wir stellten daher eine Reihe von diesbezüglichen Versuchen an und geben in der nachfolgenden Tabelle einen derselben wieder (siehe p. 403).

Es zeigt sich also, daß auch die toxinentgiftende Wirkung der Seife zum größten Teile durch Serumzusatz aufgehoben wird. Dabei ist die Art des verwendeten Serums (Bock, Pferd usw.) nebensächlich.

Desgleichen erwies es sich als irrelevant, wie uns andere Versuche lehrten, ob Seife und Serum längere Zeit aufeinander einwirken, bevor man die Toxinlösung zusetzt, oder ob man die Mischung von Seife, Serum und Tetanusgift unmittelbar aufeinander folgen läßt. Zwischen Mischung und Auswertung muß jedoch ein bestimmter Zeitraum verstreichen.

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Orig., Heft 1 u. 2.

2) Proc. of Soc. of exp. Biol. New York, Vol. 4, 1907; Biochem. Zeitschr., Bd. 6, p. 327.

3) Biochem. Zeitschr., Bd. 4, 1907; Arch. f. Hyg., Bd. 62, 1907.

4) Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, 1907.

5) Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, 1907.

6) Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.

7) Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908.

In physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Tetanustrockentoxin wird zu je 3 ccm in Röhrchen verfüllt und mit derselben Menge NaCl-Lösung, resp. Seifenemulsion, resp. Seifen-Serumgemisch, welch letzteres 8 Std. vorher bei Zimmertemperatur gestanden hatte, vermengt. Die Proben blieben nun mit einer entsprechenden Kontrolle von Toxin + Serum durch 18 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Dann erfolgte die Giftbestimmung jeder einzelnen Probe durch intramuskuläre Injektion an weißen Mäusen.

## Versuch vom 11. Okt.

Material	Menge des injizierten Gemisches	Resultat
3,0 ccm Toxin + 3,0 ccm NaCl	0,2	12. X. lok. Tet., 13. X. †
	0,1	12. X. lok. Tet., 13. X. †
	0,05	12. X. †, 13. X. lok. Tet., 14. X. †
	0,02	12. X. †, 13. X. lok. Tet., 15. X. schwerer Tet., 19. X. †
	0,01	12. X. †, 13. X. †, 14. X. lok. Tet., 15. X. schwerer Tet., 19. X. †
3,0 ccm Toxin + 1,5 ccm Natr. olein. 1-proz. + 1,5 ccm NaCl	0,2	überlebt ohne Erscheinungen
	0,1	dgl.
	0,05	dgl.
	0,02	dgl.
	0,01	dgl.
3,0 ccm Toxin + 1,5 ccm Natr. olein. 1-proz. + 1,5 ccm Serum (Bock)	0,2	12. X. lok. Tet., 13. X. †
	0,1	12. X. †, 13. X. Tet., 14. X. †
	0,05	12. X. †, 13. X. lok. Tet., 15. X. †
	0,02	13. X. †, 14. X. lok. Tet., 16. X. schwerer Tet., überlebt
	0,01	13. X. †, 14. X. lok. Tet., 16. X. deutlicher Tet., überlebt
3,0 ccm Toxin + 1,5 ccm Serum (Bock) + 1,5 ccm NaCl	0,2	12. X. lok. Tet., 13. X. †
	0,01	12. X. †, 13. X. lok. Tet., 14. X. †

Es kam nun in Frage, ob lediglich durch Serumeiweiß resp. Albumin (nach Friedemann und Sachs) die hämolytische, bezw. toxinentgiftende Eigenschaft der Seifen aufgehoben werden kann, oder ob hier nicht mehr physikalisch-chemische Vorgänge sich abspielen, deren Träger verschiedene Kolloide sein können. Wir wissen ja, daß die Gegenwart von Kolloiden bei den Absorptionsaffinitäten zwischen Antigenen und bestimmten Lipoiden von bedeutendem Einflusse ist.

Wir haben daher die Wirkung mehrerer Kolloide zunächst auf ihr Verhalten zur Seifenhämolyse untersucht und konnten

finden, daß z. B. Albumosen (Pepton Witte) die blutlösenden Eigenschaften von Natrium oleinicum aufzuheben vermögen.

In der nachstehenden Tabelle sei ein Versuch als Beispiel angeführt:

Die von uns verwendete 1-proz. Seifenemulsion löste in einer Verdünnung 1:40 1 ccm 5-proz. Kaninchenblutaufschwemmung komplett.

Es wurde je 1 ccm einer Seifenverdünnung 1:20 in Röhrchen verfüllt, dazu absteigende Mengen von 10-proz. Peptonlösung (Witte) zugefügt und dann 1 ccm Kaninchenblut (3mal gewaschen) beigegeben. Die Ablesung des Resultates erfolgte nach 2-stündigem Aufenthalte der Proben bei 37°.

	Zusatz von Pepton Witte 10-proz.	Blutmenge	Resultat
$\frac{1}{20}$ Natr. olein. 1-proz.	1,0	1 ccm 5-proz. Kanin- chenblut- auf- schwem- mung	keine Hämolyse
	0,5		dgl.
	0,1		starke Hämolyse
	0,05		komplette Hämolyse
	0,025		
	0,0125		
$\frac{1}{20}$ Natr. olein. 1-proz. ø	0,00625		komplette Hämolyse keine Hämolyse
	ø 1,0		

Der Ausfall dieser Versuche rechtfertigt auch die folgenden, die wir auf Grund der Annahme anstellten, daß wohl auch die Toxinentgiftung durch Seife nicht nur durch Serum, sondern auch durch andere Körper gehemmt werden kann.

Wie das folgende Versuchsbeispiel zeigt, hat sich unsere Vermutung vollauf bestätigt (siehe Tabelle auf p. 405).

Es haben also nicht nur die Albumosen im „Pepton Witte“, sondern auch Gelatine eine deutlich hemmende Wirkung auf die entgiftenden Eigenschaften der Seifen, wobei allerdings bemerkt werden muß, daß Gelatine, wenigstens in der gewählten Konzentration, von geringerer Wirksamkeit zu sein scheint.

Im engen Anschlusse an die hier mitgeteilten Resultate stehen Versuche von Landsteiner und Raubitschek (l. c.), die zeigen konnten, daß die absorbierende Fähigkeit von Kaolin gegenüber Arachnolysin in Gegenwart von Pepton und Kaninchenserum viel schwächer ist, als in physiologischer Kochsalzlösung.

Je 1 ccm Tetanustoxin (Trockentoxin in physiologischer NaCl gelöst) wird in Röhrchen verfüllt und mit der gleichen Menge Kochsalzlösung, resp. Seife + NaCl, Seife + Pepton 10-proz. (Lackmus neutral), Seife + Gelatine 1-proz. (Lackmus neutral), [die letztgenannten zwei Proben nach vorheriger Bindung durch 8 Stunden bei Zimmertemperatur] versetzt. Die Giftbestimmung erfolgte auch hier wie oben nach 18 Stunden bei Zimmertemperatur an weißen Mäusen; alle nötigen Kontrollen wurden unter gleichen Bedingungen angestellt.

Versuch vom 16. Okt. 1908.

Material	Menge des injizierten Gemisches	Resultat
1 ccm Toxin + 1 ccm NaCl	0,2 0,1 0,01	17. X. lok. Tetan., 18. X. † 17. X. †, 18. X. Tetan., 19. X. † 17. X. †, 18. X. lok. Tetan., 22. X. schwerer Tetan.; überlebt
1 ccm Toxin + 0,5 ccm Natr. olein. 1-proz. + 0,5 ccm NaCl	0,2 0,1 0,01	überlebt ohne Erscheinungen dgl. dgl.
1 ccm Toxin + 0,5 ccm Natr. olein. 1-proz. + 0,5 ccm Gelatine 1-proz.	0,2 0,1 0,01	17. X. †, 18. X. lok. Tetan., 19. X. schwerer Tetan., 20. X. † 17. X. †, 19. X. lok. Tetan., 22. X. schwerer Tetan., 23. X. † 17. X. †, 23. X. lok. Tetan.; überlebt
1 ccm Toxin + 0,5 ccm Natr. olein. 1-proz. + 0,5 ccm Pepton 10-proz.	0,2 0,1 0,01	17. X. †, 18. X. stark. Tetan., 19. X. † 17. X. †, 18. X. Tetan., 19. X. † 17. X. †, 19. X. lok. Tetan., 22. X. schwerer Tetan.; überlebt
1 ccm Toxin + 0,5 ccm Gelatine 1-proz. + 0,5 ccm NaCl	0,2 0,01	17. X. lok. Tetan., 18. X. † 17. X. †, 18. X. lok. Tetan., 22. X. schwerer Tetan., 23. X. †
1 ccm Toxin + 0,5 ccm Pepton 10-proz. + 0,5 ccm NaCl	0,2 0,01	17. X. lok. Tetan., 18. X. † 17. X. †, 18. X. lok. Tetan., 22. X. schwerer Tetan.; überlebt
0,5 ccm Pepton 10-proz. + 1,5 ccm NaCl	0,5	überlebt ohne Erscheinungen
0,5 ccm Gelatine 1-proz. + 1,5 ccm NaCl	0,5	dgl.

Wir möchten nun noch auf einen Punkt aufmerksam machen, der uns nicht unwichtig erscheint.

In den bisherigen Versuchen haben wir stets eine Lösung von Tetanustrockentoxin in physiologischer Kochsalzlösung verwendet und gerade für ein derartiges Gift die Seifenwirkung nachweisen können. Bei dieser Versuchsanordnung haben wir es eben mit einer Giftlösung zu tun, die sehr konzentriert ist, und relativ wenig Albumosen (aus den Peptonpräparaten) enthält.

Originalfiltrate von Tetanusbouillonkulturen eignen sich zu solchen Versuchen wenig oder gar nicht, da die in diesen Giftlösungen enthaltenen Peptone resp. Albumosen gegenüber dem Toxin in großer Menge vorhanden sind und infolgedessen eine Hemmung der Entgiftung durch Seife bewirken.

Der nachfolgende Versuch zeigt dies in völlig eindeutiger Weise:

Es wurden zwei annähernd gleich giftige Tetanustoxine, und zwar ein Bouillonkulturfiltrat und eine Auflösung von Trockentoxin in NaCl, verwendet, in der schon oft erwähnten Weise mit 1-proz. Natrium oleicum versetzt und nach 18-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur an weißen Mäusen ausgewertet.

Versuch vom 22. Okt. 1906.

Material	Menge des injizierten Gemisches	Resultat
1,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung + 1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	0,2 0,02 0,002	überlebt ohne Erscheinungen dgl. dgl.
1,0 ccm Tetanusbouillonkulturfiltrat + 1,0 ccm Natr. olein. 1-proz.	0,2 0,02 0,002	23. X. ♂, 24. X. schwerer Tetan., 25. X. † 23. X. ♂, 24. X. ♂, 25. X. lok. Tetan., 26. X. deutl. Tetan.; überlebt überlebt ohne Erscheinungen
1,0 ccm Tetanusbouillonkulturfiltrat + 1,0 ccm Bouillon	0,2 0,02 0,002	23. X. lokal. Tetan., 24. X. † 23. X. lokal. Tetan., 24. X. † 23. X. ♂, 24. X. Spur lokal. Tetan., 25. X. deutl. Tetan. 29. X. †
1,0 ccm Tetanustrockentoxinlösung + 1,0 ccm Bouillon	0,2 0,02 0,002	23. X. Tetanus, 24. X. † 23. X. Tetanus, 24. X. † 23. X. lok. Tetan., 24. X. id., 25. X id., 28. X. Tetan., 29. X. †



Die von uns mitgeteilten Versuchsergebnisse entbehren sicherlich nicht eines theoretischen Interesses, da durch sie neue Beziehungen gewisser Antigene zu bestimmten Substanzen von Fettcharakter aufgedeckt wurden.

Vielleicht vermag man aber daraus auch für die Praxis der Immunisierung einen Vorteil ziehen, wenn es gelingt, durch ungiftige Seifen-Toxingemische wirksame Antitoxine darzustellen.

Diesbezügliche Versuche sind im Gange und sollen später mitgeteilt werden.

#### **Zusammenfassung.**

Die im vorstehenden veröffentlichten Experimente zeigen, daß Emulsionen von Natrium oleinicum eine entgiftende Wirkung auf jene Antigene auszuüben imstande sind, die, als Neurotoxine, eine hohe Affinität zum Zentralnervensystem haben und auch in vitro durch Gehirnbrei und lipoide Substanzen neutralisiert werden können.

Diese entgiftende Wirkung der Seife kann durch Zusatz von Normalserum, durch Albumosen und Gelatine, in ähnlicher Weise gehemmt werden, wie ihre hämolysierende Eigenschaft.

Wien, Ende Dezember 1908.

[Aus der Impfungsabteilung des Bakteriologischen Institutes in Kiew; Vorsteher: Professor W. Wyssokowitsch.]

### **Ueber die Wirkung des Alkohols auf die Tätigkeit der Phagocyten.**

Von Dr. A. W. Kruschilin.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. Jan. 1909.)

Während seiner Studien über die experimentelle Cholera hat Koch an durch den Magen infizierten Kaninchen die Erfahrung gemacht, daß ein vorhergehendes Einführen von Alkohol in den Magen den Erfolg des Experimentes beschleunigte. Dasselbe wurde später durch Doyen bestätigt.

Von diesen Beobachtungen und von der von vielen Forschern festgestellten Tatsache ausgehend, daß bei Cholera-epidemien meistens diejenigen Leute erkrankten, die sich verschiedenen Exzessen (insbesondere dem Gebrauch von Alkohol) hingeben, stellte sich Thomas die Aufgabe, die prädisponierende Rolle des Alkohols durch Versuche an Tieren zu untersuchen.

Seine Kaninchen erhielten die 2 ersten Tage je 6—7 ccm, den 3. Tag 10—12 ccm Aethylalkohol (mit 4—5 Teilen Wasser verdünnt, um eine Reizung der Magenschleimhaut zu vermeiden). Bevor die Tiere die Alkoholnarkose überstanden, wurde ihnen in die Ohrvene die Cholerakultur injiziert. Während alle alkoholisierten Tiere starben, blieben die Kontrolltiere am Leben. In einem Falle blieb bei einem Tiere die Infektion 18 Tage lang in latentem Zustande, erst am 19. Tage erlag das bisher anscheinend gesunde Tier unter Durchfällen und Krämpfen. Die Möglichkeit einer selbständigen Infektion wurde nach den Angaben von Thomas ausgeschlossen. Die Sektion ergab bei allen Tieren einen zusammengefallenen Dünndarm mit charakteristischem sahnartigen Inhalt gefüllt, die Serosahaut stark injiziert und reine Cholerakultur im Kot.

Da die Versuchstiere je 0,7—0,8, die Kontrolltiere aber zu 4,5—4,7 Teilstriche der Spritze bekamen, schließt daraus Thomas, daß der Alkohol die Prädisposition zur Cholera beinahe aufs Sechsfache steigert.

Im Jahre 1896 hat Abbot die Rolle des Alkohols bei einer Infektion der Kaninchen durch Kulturen des *B. coli*, *staphylococcus* und *streptococcus* studiert. Es ergab sich, daß die alkoholisierten Tiere zugrunde gingen, während die Kontrolltiere am Leben blieben; überhaupt hatte die Infektion bei den ersteren viel tiefere und weiter gehende Läsionen als bei den Kontrolltieren verursacht.

Schließlich ist in einer im Jahre 1900 erschienenen Arbeit von F. Laitinen dieselbe Frage ausführlich erörtert worden. Der Autor hat an 342 Tieren die Wirkung des Alkohols auf den Gang der chronischen und akuten Infektion und Intoxikation studiert. Die Versuche wurden an Hunden, Kaninchen, Meerschweinchen, Hühnern und Tauben angestellt. Für die akute Infektion diente eine Kultur von Anthrax (Virus und I Vaccin); zur chronischen Infektion wurde der Tuberkelbacillus und zur Vergiftung das Diphtherietoxin gebraucht.

Der Verfasser konnte dabei die Wirkung der akuten sowie der chronischen Vergiftung durch den Alkohol studieren. Der Alkohol (mit 3 Teilen Wasser verdünnt) wurde entweder mit einer Pipette in den Mund oder mit einer weichen Sonde unmittelbar in den Magen eingeführt. Die Hunde vertrugen leicht 5—6 ccm, die Kaninchen 5—10 ccm, die Hühner 2,5—5,0 ccm, die Meerschweinchen nicht mehr als 2,5 ccm, die Tauben nicht mehr als 1,5 ccm (des reinen Alkohols) pro Dosis. Die Experimente mit dem I Vaccin für Kaninchen und mit Virus für Hunde, Tauben und Hühner wurden folgenderweise ausgeführt:

1) Am Tage der Ansteckung wurde den Tieren eine große Dosis Alkohol gegeben.

2) Am Tage der Ansteckung bekamen die Tiere eine kleine Dosis Alkohol.

3) Vor der Ansteckung wurden die Tiere täglich durch Alkohol vergiftet (die Kaninchen 14—54 Tage, 22—61 Tage die Hunde, 12—23 Tage die Tauben und 16—17 Tage die Hühner).

Es ergab sich, daß in allen Fällen, unabhängig von der Größe der Dosis und Art der Einführung, der Alkohol eine sichtbare Steigerung der Prädisposition zur Erkrankung verursacht hatte: alle alkoholisierten Tiere erlagen einer spezifischen Infektion, während die Kontrollen am Leben blieben.

Weniger ausgesprochen war die Wirkung des Alkohols auf den Gang der tuberkulösen Infektion; der Autor erklärt das dadurch, daß die von ihm angewandte Menge des Giftstoffes die minimale Dosis für die Kontrolltiere übertraf.

Der Einfluß des Alkohols bei der Intoxikation gab sich dadurch zu erkennen, daß bei den alkoholisierten Tieren ein Einführen des Diphtherietoxins viel schneller den Tod verursachte als bei den Kontrolltieren.

Auch die Steigerung der Temperatur war bei den alkoholisierten Tieren höher und dauerte länger als bei den Kontrolltieren. Zu denselben Schlußfolgerungen über den Einfluß des Alkohols auf die Vergiftung durch Diphtherietoxin sind Valagussa und Canaletti gekommen.

Mit diesen, obgleich nicht zahlreichen, aber übereinstimmenden Versuchen wird die Bedeutung des Alkohols als eines prädisponierenden Faktors für die Infektion und Intoxikation erwiesen.

Den zur Cholera prädisponierenden Einfluß des Alkohols haben Koch und Doyen durch Reizung der Magenschleimhaut erklärt. Diese Vermutung ist aber durch Doyens Kontrollversuche nicht bestätigt worden: die Prädisposition zur Cholera wurde durch ein vorhergehendes Einführen von Krotonöl, Bittersalz oder Kantaridin in den Magen nicht gesteigert. Die prädisponierende Rolle des Alkohols für solche Bakterien, welche in den Magendarmkanal nicht eindringen, sondern (wie in den Versuchen von Abbot und Laitinen) unmittelbar ins Blut eingeführt werden, zwingt uns, eine andere Erklärung der besprochenen Eigenschaft des Alkohols zu suchen, abgesehen von seiner Wirkung auf die Verdauungsorgane.

Im Jahre 1891 hat Strauss die bakteriziden Eigenschaften des Blutes der alkoholisierten Kaninchen studiert. Die Kaninchen erhielten zwei Tage nacheinander je 10 ccm von absolutem Alkohol unmittelbar in den

Magen (mit einer weichen Sonde eingeführt). Das Blut wurde der Arteria carotis des Tieres entnommen, ehe das letztere die Alkoholnarkose überwunden hatte.

Gleichzeitig angestellte Versuche bewiesen eine starke Abnahme der bakteriziden Eigenschaften des Serums der Versuchstiere für die Cholera-vibrien.

Im Jahre 1897 veröffentlichte Déléarde seine Arbeit über den Einfluß des Alkohols auf die Erzeugung der Immunität.

Die Versuche wurden an Kaninchen angestellt, denen verschiedene Mengen von 48-proz. Alkohol (je nach dem Gewichte der Tiere) durch eine weiche Sonde in den Magen eingeführt wurden: anfangs zu 6–8 ccm, später zu 10–12 ccm pro Dosis.

Die Versuche wurden in drei Modifikationen angestellt: der Alkohol wurde gleichzeitig mit der Immunisierung gegeben; dann vor der Immunisierung und schließlich, nachdem die Immunität erzielt wurde. Es ergab sich folgendes:

1) Für die Tollwut kann keine Immunität erzielt werden, wenn die Tiere gleichzeitig alkoholisiert werden. Die schon erzeugte Immunität konnte aber durch anderthalbmonatige Einführung von Alkohol nicht zerstört werden. Gleichfalls konnte eine vorhergehende monatliche Alkoholisierung, die erst einen Tag vor dem Beginn der Immunisierung unterbrochen wurde, die Erzeugung der Immunität nicht verhindern.

2) Eine mit der Vaccination gleichzeitige Alkoholisierung verhinderte die Erzeugung der Immunität gegen Tetanus. Die Einführung des Alkohols innerhalb eines Monats vor der Immunisierung (den letzten Tag vor dem Beginn der Immunisierung bekam das Tier keinen Alkohol) verhinderte nicht die Erzeugung der Immunität.

3) Eine mit der Vaccination gleichzeitige Alkoholisierung verhinderte die Erzeugung der Immunität gegen Anthrax.

Der Autor zieht aus seinen Experimenten diejenige Schlußfolgerung, daß eine mit der Immunisierung mit Bakterien oder Toxinen gleichzeitige Einführung von Alkohol jedenfalls eine Abschwächung der immunitäts erzeugenden Kräfte verursacht. Der Einfluß des Alkohols auf die hämolytischen Eigenschaften des Blutes wurde im Jahre 1902 von Abbot und Bergey studiert.

Bei der Mehrzahl der alkoholisierten Kaninchen wurde ein Verlust an den hämolyisierenden Stoffen um 120 Proz. (im Vergleich mit normalen Kaninchen) beobachtet (in manchen Fällen noch mehr); es wurde nicht nur die Menge des Komplements, sondern auch die des spezifischen Ambozeptors vermindert. Der Einfluß des Alkohols bei der künstlichen Immunität war dadurch zu bemerken, daß nach der Einführung von gewaschenen roten Blutkörperchen von einem Rinde die alkoholisierten Tiere zugrunde gingen, während alle Kontrolltiere am Leben blieben.

Die Experimente von Strauss, Délearde, Abbot und Bergey erlauben uns, im Alkohol ein Agens zu sehen, das unmittelbar die Schutzvorrichtung des Organismus beeinflusst, und auf diese Weise die Steigerung der Empfindlichkeit des Tieres gegen die Ansteckung zu erklären. Obgleich die humorale Theorie den flüssigen Bestandteilen des Blutes die Hauptrolle in der schützenden Tätigkeit des Organismus zuerkennt und die Phagocytose für eine konkomitierende Erscheinung hält, kann doch die Bedeutung der phagocytären Reaktion in der Reihe der schützenden Kräfte des Organismus nicht erschüttert werden. Deswegen war es von Interesse, die Wirkung des Alkohols auf die Phagocytose zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit ist auf den im Jahre 1886 veröffentlichten Untersuchungen von W. K. Wyssokowitsch über die Schicksale der ins Blut injizierten Mikroorganismen begründet.

Mit mathematischer Genauigkeit stellte W. K. Wyssokowitsch durch sorgfältige Experimente fest, daß die ins Blut injizierten pathogenen sowie nicht-pathogenen Mikroorganismen bald aus dem Blute verschwinden. Die Ursache dieser Erscheinung ist in den Endothelzellen der verschiedenen Organe zu suchen, von denen die Bakterien aufgenommen werden, hauptsächlich in der Milz (die Endothelzellen der Kapillaren und die jungen großen parietalen Endothelzellen), der Leber (die Endothelzellen der Gefäße und die Kupferschen Zellen), des Knochenmarks (die Endothelzellen der Kapillaren). Entweder gehen sie hier zugrunde oder sie fangen an, sich zu vermehren und treten in die Blutbahn ein, wodurch sie den Tod des Tieres hervorrufen.

Wir stellten uns die Aufgabe, die Wirkung des Alkohols auf den eben bezeichneten Gang der Infektion zu untersuchen und (in erster Linie) die Schnelligkeit des Verschwindens der Bakterien aus der Blutbahn festzustellen.

Die Versuche wurden an Kaninchen angestellt.

Aethylalkohol wurde in die Ohrvene injiziert. Diese Art der Einführung des Alkohols erlaubt eine genaue Dosierung und hat große Vorzüge im Vergleich mit dem Einführen in den Magen, da sie bei gewissen Bedingungen keine Komplikationen gibt. Zuerst wurde Alkohol unmittelbar ins

Blut durch J. D. Major im Jahre 1664 eingeführt, und dann wurde die Einspritzung in die Ohrvene von manchen Forschern (in Rußland von Setchenow und Danillo) gewählt, um absoluten oder verdünnten Alkohol in den Organismus einzuführen.

Den letalen Ausgang in einigen Fällen erklärten die Autoren durch ein Gerinnen des Blutes. Was die beim inneren Einführen von Alkohol tödliche Dosis anbetrifft, so wird sie von Bouchard als 4,7 ccm von 20-proz. Alkohol per Kilogramm gerechnet, Joffroy und Serveaux halten für die echte toxische Dosis für Hunde 6,5 ccm und 6,9 ccm absoluten Alkohols per Kilogramm bei einer Schnelligkeit der Einführung von 1 ccm absoluten Alkohols in 1 Minute. (Bei ihren Versuchen haben die Autoren 18—20-proz. Alkohol gebraucht.)

Durch Vorversuche haben wir uns die Bedingungen, bei denen die Injizierung von Alkohol durch die Ohrvene gefahrlos bleibt, klar gemacht; dabei stellten wir zwei Dosen fest: eine große Dosis, die eine Narkose hervorrief, und eine kleine, die keinen sichtbaren Einfluß auf das Tier ausüben konnte.

Als große Dosis nahmen wir 10 ccm von 25-proz. Alkohol per Kilogramm an (der Alkohol wurde durch physiologische Lösung verdünnt), mit der Schnelligkeit von 5 ccm per Minute injiziert, was ungefähr die Hälfte der tödlichen Dosis von Joffroy und Serveaux ergab; die kleine Dosis enthielt die Hälfte der großen, mit gleicher Schnelligkeit injiziert; die Lösung wurde bis 37° C erwärmt.

Die Erfüllung dieser Forderungen garantierte uns den Schutz vor unangenehmen Komplikationen.

Nach der Einführung der großen Dosis verfiel das Tier augenblicklich in eine tiefe Narkose, erst in 10—15 Minuten begann es sich zu bewegen, vollkommen hergestellt war es in 30—40 Minuten. Wenn wir dagegen die Schnelligkeit des Einspritzens erhöhten, so erfolgte charakteristisches Piepsen und momentaner Tod. Der andere von uns erprobte Weg der Alkoholeinführung — die Injektion in die Bauchhöhle — erwies sich gleichfalls als gefahrlos. Die Einspritzung wurde mit einer breiten Nadel mit schrägem Ende gemacht, die Nadel wurde vorsichtig in eine tiefe Falte der Bauchwand eingeführt, um eine Verletzung der Darmschlingen zu vermeiden. 10 ccm,

auf einmal injiziert, erzeugten eine Narkose, die nach 10—15 Minuten allmählich eintrat und 45 Minuten bis 1 Stunde dauerte. Die Einspritzung in die Bauchhöhle wählten wir in denjenigen Fällen, wo die Einspritzung in die Ohrvene unmöglich war.

Bei den Vorversuchen ertrugen die Tiere 1—2 Monate lang eine tägliche Einführung der großen Dosis ganz gut (die ersten Tage durch die Ohrvene, die folgenden intraperitoneal injiziert). Die größte von einem Kaninchen ertragene Menge Alkohols war die vierfache große Dosis, in folgender Weise eingeführt: nach  $\frac{1}{2}$  Stunde, nach 2 Stunden und nach 9 Stunden.

In dem größten Teil unserer Versuche beschränkten wir uns auf eine einmalige Alkoholeinführung einige Minuten vor der Infektion, in einigen Versuchen wurde das Injizieren in einer halben Stunde wiederholt; in einem Falle bekamen die Tiere Alkohol einen Tag vor dem Versuche und am Tage des Versuches; in einem anderen wurde der Alkohol 5 Tage lang nach dem Tage der Ansteckung gegeben, und endlich ließen wir einmal die Kaninchen 10 Tage lang vor dem Versuche und am Tage des Versuches selbst Alkohol einnehmen.

Wir benutzten für unsere Versuche Sporen von *B. subtilis*, *B. anthracis* und *Staphylococcus pyogenes aureus*.

*B. subtilis* wurde in flachen Kolben in Bouillon eingepflegt, 2—3 Wochen lang im Brutschrank bei 37° stehen gelassen; nach dieser Zeit hörte die Kahlhautbildung auf, und in den Kolben bildete sich ein kleinkörniger Bodensatz. Die Sporen von *B. anthracis* wurden einer vierwöchentlichen virulenten Kultur entnommen. Die Bouillonkultur wurde vor dem Einspritzen mit 200 Teilen physiologischer Lösung verdünnt.

Vor der Einspritzung wurden die Kulturen von *B. subtilis* und *B. anthracis* bis 90° C erwärmt.

Den *Staphylococcus pyogenes aureus* gebrauchten wir von schwacher (Serie B) und von stärkerer (Serie C) Virulenz. In beiden Fällen wurde die 24-stündige Kultur auf Agar durch 5 ccm physiologischer Lösung abgespült.

Eine genaue Bestimmung der Zahl der injizierten lebensfähigen Bakterien wurde nach der zuerst von Prof. Wyssokowitsch empfohlenen Methode erlangt. Durch sukzessive genaue Verdünnungen erhielt man eine Kultur, von der man eine genau abgemessene Quantität auf festen Nährböden ein-

impfen konnte; die Aussaat ergab eine Anzahl Kolonien, die leicht zu zählen war. Auf diese Weise war es leicht, die Zahl der injizierten lebensfähigen Individuen festzustellen.

Die Probe des Blutes wurde immer mit ein und derselben Platinöse genommen; die abgeschabte Masse der Organe mit einem Löffelchen, mit dem man bequemer gleiche Quantitäten des Stoffes abmessen konnte als mit der Messerspitze.

Die Einimpfungen wurden in Röhrchen mit flüssigem Agar (bei 42°) gemacht; nach sorgfältigem Durchschütteln ließen wir den schräg stehenden Agar erkälten. Diejenigen Proben, welche neben den vegetativen Formen auch Sporen enthalten konnten, wurden gleichzeitig auf Agar von 42° und von 90° C eingeimpft.

Der Verlauf des Experimentes war im allgemeinen folgender: Beide Ohren eines Kaninchens wurden rasiert, mit Seife, Spiritus, Aether, Sublimat, steriler physiologischer Lösung gewaschen und mit sterilem Fließpapier getrocknet; dann wurde Alkohollösung eingespritzt und die Blutung mit sterilem Papier gestillt. In die Ohrvene am Rande des anderen Ohres wurde unmittelbar darauf die Kultur injiziert. Die Proben des Blutes wurden der in der Mitte des ersten Ohres liegenden Arterie entnommen: es wurden sukzessive Einschnitte gemacht, wobei die bestimmte Stelle vor jedem Schnitte aufs sorgfältigste mit Spiritus und Aether gewaschen und die Blutung mit einem glühendem Messer gestillt wurde. Mit denselben Vorsichtsmaßregeln verfuhr man bei der Sektion der gefallenen und der durch Chloroform getöteten Tiere, oder wenn man Aussaaten ihren Organen entnahm.

Im ganzen habe ich 18 Versuche angestellt, jedesmal an 3—6 Tieren, wobei ein Teil eine große, der zweite eine kleine Dosis Alkohol erhielt und der dritte Teil als Kontrolle diente.

In einer Versuchsreihe haben wir den Einfluß des Alkohols auf die Schnelligkeit der Elimination untersucht. Das letztere war die Grundaufgabe unserer Arbeit, und zu der dritten Gruppe gehörte der größte Teil unserer Versuche.

In der zweiten Gruppe stehen 2 Versuche an 9 Kaninchen (Versuch XVII und XVIII). Der Versuch XVII der ersten Gruppe an 6 Kaninchen gehört auch teilweise dazu. Wir versuchten den Einfluß des Alkohols auf den Gang der Anthrax-Septikämie in dieser Versuchsgruppe zu bestimmen.



Zu der Analyse der einzelnen Versuche übergehend, müssen wir vor allem einige Unregelmäßigkeiten im Gange der Elimination feststellen. So sind die Aussaaten, die wir 15 Minuten nach der Ansteckung dem Blute des ersten und dritten Kaninchens aus Versuch I entnahmen, steril geblieben, Blutproben aber, die demselben Kaninchen nach Verlauf einer Stunde entnommen wurden, zeigten Wachstum. In demselben Versuche verlief die Elimination des alkoholisierten wie die des Kontrolltieres mit gleicher Schnelligkeit.

Unregelmäßigkeiten dieser Art sind durch die kleine Quantität des Impfstoffes und durch die kurze Dauer der Beobachtung zu erklären.

Jedenfalls ließ sich die Wirkung des Alkohols mit wenigen Ausnahmen darin bemerken, daß der Prozeß des Verschwindens der Sporen und Kokken aus dem Blute im allgemeinen langsamer verlief.

Diese Wirkung ist deutlich bei großen Dosen zu unterscheiden, in den Versuchen mit kleinen Dosen aber läßt sie sich nicht so leicht bestimmen. Die hemmende Eigenschaft des Alkohols hat sich ferner bei den Experimenten mit Impfstoffen aller Art gezeigt, ausgesprochener aber zeigt sie sich in den Versuchen mit Anthrax-Sporen und mit der virulenten Kultur des *Staphylococcus pyogenes aureus*. So hat sich das Blut aller Kontrolltiere in der Versuchsserie D 30 Minuten nach der Infektion als steril erwiesen, während Aussaaten aus den alkoholisierten Tieren in 1—1½ Stunde nach der Ansteckung Wachstum zeigten; in der Serie C zeigten die Blutproben, die man den Kontrolltieren 15—18 Minuten nach der Infektion entnahm, Wachstum; bei alkoholisierten Tieren aber erst nach Verlauf von 2 Stunden. Die Wirkung der großen Alkoholdosen war insbesondere im Versuch XIII zu bemerken: die Tiere bekamen 10 Tage lang vor dem Versuche eine große Dosis Alkohol, und die Elimination der Kontrolltiere verlief viel schneller und weit vollkommener als bei den alkoholisierten.

Beim sekundären Erscheinen der ausgewachsenen Anthraxsporen im Blute gibt sich der Einfluß des Alkohols gleichfalls zu erkennen: im Blute der Kontrolltiere werden die ersten Bakterien nach Verlauf von 21—24 Stunden nach der Ansteckung gefunden, während bei den alkoholisierten Tieren

No. des Versuches	No. des Kaninchens	Gewicht des Kaninchens	Die Menge des injizierten Alkohols			Nach welcher Zeit wurde die Kultur injiziert		Die Menge der injizierten Kultur		Aussaaten aus dem Blute. Die Zahl der ausgewachsenen Kolonien			Nach welcher Zeit wurde das Tier getötet (oder kreierte)	Aussaaten aus den Organen				
			ccm	8'	10	m	Kol.	Kol.	Kol.	St.	Kol.	Milz		Leber	Niere	Blut	Urin	
I.	1	♂ 1210 g	13	8'	10	5'-14	15'-0	0	1 St.	-2	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	♂ 1430 "	5	3'	10	5'-9	15'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	♂ 1030 "	Kontrolle		10	5'-2	15'-0	0	1 "	-2	—	—	—	—	—	—	—	—
II.	4	♂ 1120 "	12	5'	17	8'-15	28'-3	3	1 "	-2	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	♂ 1170 "	4	3'	17	5'-6	25'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	♂ 1220 "	Kontrolle		17	5'-6	25'-0	0	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
III.	7	♂ 1310 "	13	3'	15	3'-27	15'-6	6	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	♀ 1250 "	12	5'	15	5'-18	17'-6	6	1 "	-1	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	♂ 1100 "	5	3'	15	3'-18	17'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
10	♂ 1370 "	5	3'	15	3'-15	16'-0	0	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	♀ 1210 "	Kontrolle		15	5'-6	15'-0	0	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	12	♀ 1300 "	"		15	5'-9	15'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
IV.	13	♀ 1110 "	10	5'	16	3'-9	17'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	14	♀ 970 "	10	5'	16	5'-18	15'-2	2	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
	15	♂ 1230 "	5	5'	16	5'-6	16'-0	0	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—
16	♂ 1030 "	Kontrolle			16	3'-10	15'-0	0	1 "	-0	—	—	—	—	—	—	—	—

[illegible][illegible]

No. des Versuches	No. des Kaninchens	Gewicht des Kaninchens	Die Menge des injizierten Alkohols		Nach welcher Zeit wurde die Kultur injiziert		Die Menge der injizierten Kultur		Aussaaten aus dem Blute. Die Zahl der ausgewachsenen Kolonien										Nach welcher Zeit wurde das Tier getötet (oder kreierte)		Aussaaten aus den Organen				
			ccm	2'	m	Kol.	Kol.	1 St.	3'—1	2 St.	Kol.	Kol.	—	Das gesunde Tier wurde nach 48 St. getötet	Kol.	1	1	∞			0	∞	Milz	Leber	Niere
XII.	40	♀ 1040 g	3	2'	500	2'—400	16'—7	1 St.	3'—1	2 St.	—0	—	Das gesunde Tier wurde nach 48 St. getötet	1	1	∞	0	∞	∞	1	1	∞	0	0	
	41	♂ 950 g	3	2'	500	2'—400	15'—6	1 "	—3	1 "	55'—2	—	Das erkrankte Tier wurde nach 21 St. getötet	500	500	∞	200	∞	∞	500	500	∞	200	∞	
	42	♂ 970 g	Kontrolle	500	500	2'—400	14'—2	1 "	1'—2	2 "	1'—0	—	Nach 22 St. getötet	500	500	∞	100	∞	∞	500	500	∞	100	∞	
XIII.	43	♂ 840 g	"	500	500	2'—500	13'—2	1 "	2'—0	2 "	2'—0	—	Das gesunde Tier n. 48 St. getötet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	44	♂ 1110 g 10 Tage je 10 ccm 25-proz. Alkohol intraperitoneal injiziert	10	8'	20	3'—300	15'—20	1 "	—2	2 "	—1	—	Nach 48 St. getötet	3	3	2	0	0	0	3	3	2	0	0	
XIV.	45	♂ 1150 g 10 Tage je 10 ccm intraperitoneal injiziert	5 10	6'	20	3'—500	15'—300	1 "	—2	2 "	—2	—	Kreierte nach 14 St.	300	150	3	20	0	0	300	150	3	20	0	
	46	♂ 1090 g	Kontrolle	20	20	3'—75	15'—2	1 "	—0	2 "	—0	—	Nach 48 St. getötet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	47	♂ 1440 g Nach 24, 48, 72, 96 St. bekam	12 5'	5'	27	3'—200	18'—9	1 "	—2	2 "	—0	3 St.—0, 4, 24, 48, 72, 96, 144 St.—0 Kol.	Nach 144 St. mit Chlorof. getötet	Alle Organe steril											
	48	♂ 1340 g Nach 24, 48 St. bekam	10 6 5	2'	27	2'—300	17'—1	1 "	—0	2 "	—0	3 St.—0, 24, 48, 72, 96, 144 St.—0 Kol.	idem	idem											



diese Erscheinung viel früher eintrat; die Bakterien zeigten sich schon nach 14—16 Stunden. Aus einem Blutstropfen, der dem Kontrolltiere nach 26 Stunden entnommen wurde, wuchsen 18 Kolonien, ein Tropfen Blut des alkoholisierten Tieres ergab 170 Kolonien in 24 Stunden nach der Infektion.

Was die postmortalen Befunde der Versuche mit dem virulenten Staphylococcus aus der Serie C anbetrifft, so ist hier vor allem das Vorhandensein eines individuellen Unterschiedes in dem Verhältnisse der Kaninchen zum Staphylococcus nachzuweisen. Im Versuch VII z. B. waren beide Tiere, No. 42 und 43, in die nämlichen Bedingungen eines und desselben Versuches gestellt: No. 42 erlag der Septikämie, No. 43 blieb aber gesund, seine Organe erwiesen sich alle steril, auch nachdem das Tier nach 43 Stunden getötet wurde. Ungeachtet der maskierenden Einwirkung dieses Umstandes auf die Resultate der Experimente ist auch hier der Einfluß des Alkohols auf die Erkrankung der Nieren bemerkbar, denn bei allen alkoholisierten Tieren erwies es sich, daß ihre Nieren mit miliaren Eiterherden ausgefüllt wurden, während 3 von den 6 Kontrolltieren gesunde und nach Verlauf von 24 bis 48 Stunden sterile Nieren behielten.

Mit der eben besprochenen Erkrankung der Nieren stand auch das Resultat der Aussaaten aus Urin, Blut, Milz und Leber in Zusammenhang, ob die Aussaaten üppigeres oder schwächeres Wachstum zeigten. Da diese Befunde aber das Ergebnis einer sekundären Infektion sind, dürfen wir sie nicht als Grundlage zu einem entscheidenden Urteil über den Einfluß des Alkohols auf den Vernichtungsprozeß der Kokken in den Organen ansehen.

Vereinzelt steht der Versuch XIV, bei dem alle Organe der alkoholisierten sowie die der Kontrolltiere nach 144 Stunden sich als gesund und steril erwiesen; diese Ausnahme in der Versuchsserie C läßt sich durch die kleine Quantität des Impfstoffes erklären.

Es blieb uns noch, den Einfluß zu betonen, den die Alkoholisierung auf das schnellere Auftreten des Todes bei einer tödlichen Infektion ausübt: alle mit einer großen Dosis alkoholisierten Tiere (mit Ausnahme von Kaninchen No. 57) sind bei den Versuchen mit Anthraxsporen früher als die Kontrolltiere umgekommen (im Durchschnitte auf 15 Stunden).

Es ist von Wert, zu bemerken, daß in allen Fällen des schneller eintretenden letalen Ausgangs die Elimination langsamer verlief als bei Tieren, die nach größeren Zeiträumen dem Tode erlagen.

### Zusammenfassung.

1) Kleine Alkoholdosen üben keinen bemerkbaren Einfluß auf die Phagocyten aus.

2) Die großen (narkotisierenden) Dosen Alkohols beeinträchtigen die Tätigkeit der Phagocyten; diese Wirkung äußert sich in einer Abschwächung der Phagocytose und in einer Veränderung der intracellulären Prozesse; als Resultat ergibt sich eine beschleunigte Auskeimung der Sporen und ein früheres sekundäres Erscheinen der Bakterien im Blute.

3) Der genaue Zusammenhang zwischen den besprochenen Erscheinungen — der Hemmung der phagocytären Tätigkeit und dem früher eintretenden Tod des Tieres — gibt uns Anlaß, zu glauben, daß in dem Kampfe der verschiedenen Schutzvorrichtungen des Organismus mit den krankhaften Agentien unter gewissen Bedingungen der Ansteckung den phagocytären Zellen (Endothelzellen) eine wesentliche Rolle zukommt.

Vorliegende Arbeit wurde im Bakteriologischen Institut unter der Leitung des Herrn Professor W. K. Wyssokowitsch in Kiew ausgeführt, dem ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank zu äußern für eine angenehme Pflicht halte.

### Literatur.

- 1) Thomas, Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. 32, p. 38.
- 2) Laitinen, T., Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 34.
- 3) Déléarde, Annales de l'Institut Pasteur, 1897.
- 4) Abbot and Bergey, The Journal of exp. Med., Vol. 1, No. 3, zitiert aus Centralbl. f. Bakt., Bd. 32, 1902, p. 260.
- 5) Wyssokowitsch, W., Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 1.
- 6) Setschenow, Materialien zu einer künftigen Physiologie der alkoholischen Intoxikation, 1860. (Russisch.)
- 7) Bejnar, Ueber die Veränderungen des Blutkreislaufes im Gehirn unter dem Einflusse des Alkohols. 1898. (Russisch.)
- 8) Joffroy et Serveaux, Archives de Médecine expérimentale et d'Anatomie pathologique, 1897.

[Aus der Königlichen Universitätsklinik für Hautkrankheiten  
(Geh. Med.-Rat Professor Dr. Neisser), Serodiagnostische Abteilung (Dr. Bruck).]

### **Eine Vereinfachung und Verfeinerung der serodiagnostischen Syphilisreaktion.**

Von **Margarete Stern.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Jan. 1909.)

Schon vor einigen Monaten habe ich — veranlaßt durch zufällig gemachte Erfahrungen an dem im Gefrierapparat „Frigo“ aufbewahrten Meerschweinchenkomplement — hervorgehoben<sup>1)</sup>, daß seine Verwendung Ursache von Versuchsfehlern bei der Anstellung der serodiagnostischen Blutuntersuchung bei Syphilis werden kann. In der letzten Zeit bin ich durch Beobachtungen an einer täglichen Versuchsreihe von 30—40 menschlichen Seren immer mehr zu der Ansicht gekommen, daß durch das Meerschweinchenkomplement, wenn auch in seltenen Fällen, unspezifische Hemmungen und Lösungen im Versuch hervorgerufen werden können und daß das Meerschweinchen Serum neben seinem Komplementgehalt noch Substanzen enthalten kann, die auf die Syphilisreaktion störend einwirken können.

So hatte ich z. B. an einem Tage in meiner Versuchsreihe auffallend viele positive Resultate und zwar auch bei klinisch normalen Fällen mit einem erprobten Extrakt erhalten. Am nächsten Tage wurden daher diese Seren noch einmal unter genau denselben Bedingungen, nur mit anderem Meerschweinchenkomplement untersucht, und nunmehr nur bei den luetischen Seren positive Resultate erhalten. Daß die Stärke des an den beiden Tagen angewandten Komplementes bei dem verschiedenen Ausfall der Reaktionen eine Rolle gespielt hat, glaube ich ausschließen zu können, da das Komplement täglich in einem Vorversuch an ein und demselben hämolytischen Ambozeptor austitriert wurde. Daß das normale Meerschweinchen Serum zuweilen Stoffe enthalten kann, die mit Extrakt Komplementbindung ergeben, ist auch nicht

1) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 32.



besonders überraschend, da ja diese Erscheinung bei anderen Tieren, z. B. bei Affen und Kaninchen (Bruck-Stern, L. Michaelis) häufig zu beobachten ist.

Daß aber auch Meerschweinchenkomplement, das 40 Stunden im Eisschrank aufbewahrt worden ist, unter Umständen nach der entgegengesetzten Richtung störend auf die Reaktion einwirken kann, lehrte mich der Ausfall eines Versuches in letzter Zeit, als wir 17 Sera nach der ursprünglichen Wassermann'schen Methode und gleichzeitig nach der von mir modifizierten Versuchsanordnung, auf die ich später noch zurückkommen werde, (mit aktivem Serum) prüften. Während mit letzterer von 17 untersuchten Seren 11 positiv waren, was mit der klinischen Diagnose übereinstimmte, war mit ersterer kein positives Resultat zu verzeichnen, obwohl ein Versuchsfehler völlig ausgeschlossen war. Der bei beiden Versuchen verwendete Extrakt erwies sich am Tage vor und nach diesem Versuch als tadellos, abgesehen davon, daß er am Tage selbst ja auch mit aktivem Serum einwandfrei funktionierte. Das verwendete Meerschweinchenkomplement hatte nach dem vorher angesetzten Vorversuch die 3-fach komplettlösende Dosis. Das Mißlingen des Versuches ist wahrscheinlich in Komplementoidbildung im Meerschweinchen Serum zu suchen, über dessen Vorhandensein ich schon früher berichtet habe<sup>1)</sup>.

Nach diesen Erfahrungen habe ich versucht, das Meerschweinchen Serum ganz aus dem Versuch auszuschalten und es durch das eigene Komplement des zu untersuchenden menschlichen Serums zu ersetzen, indem ich die zu prüfenden Sera im aktiven Zustande untersuchte. H. Sachs hat ja schon vor längerer Zeit gezeigt, daß — allen theoretischen Erwägungen zum Trotz — das Plus des Komplementes, das er bei seinen Komplementbindungsversuchen erhielt, indem er die Sera aktiv und mit Meerschweinchenkomplement untersuchte, die Zahl seiner positiven Resultate nicht nur nicht herabsetzte, sondern daß er sogar mit der hierbei angewandten Serum- oder Extraktmenge sehr bedeutend heruntergehen mußte, wenn er richtige, spezifische Hemmungen erhalten wollte. Untersuchte Sachs

1) l. c.

aktive Sera mit denselben Dosierungen wie inaktive, so bekam er auch bei normalen Seren Hemmungen der Hämolyse.

Derartige Versuche, das menschliche Komplement zur Wassermannschen Reaktion zu benutzen, sind ja inzwischen von Tschernegubow<sup>1)</sup> und von Hecht<sup>2)</sup> gemacht worden, allerdings nur aus Gründen der Vereinfachung. Die Technik dieser beiden Methoden ist eine andere als die meinige. Während ich über die Arbeit Tschernegubows noch nicht urteilen kann, weil ich zu ihrer Nachprüfung die noch in Vorbehandlung stehenden Menschenblut-Kaninchen brauche, habe ich die Hechtsche Technik geprüft und werde auf dieselbe später eingehend zurückkommen.

Unserer Ansicht nach besteht keine Notwendigkeit, aus Gründen der Vereinfachung und Bequemlichkeit die Methode, wenigstens was das Komplement anbelangt, zu ändern und lediglich aus diesen Gründen von der Verwendung des bisher bewährten Meerschweinchenserums abzugehen. Anders ist es, wenn die Benutzung des menschlichen Komplementes bei der Wassermannschen Reaktion wirkliche Vorteile brächte. Ist dieses allerdings der Fall, so wäre eine Methode, die neben sonstigen Vorteilen auch noch die Technik vereinfachte, mit Freuden zu begrüßen.

Meine Technik der Wassermann-Neisser-Bruck-schen Reaktion ist aus der folgenden Tabelle zu übersehen, die eine Gegenüberstellung der alten und neuen Untersuchungsart darstellt.

Tabelle I.

## I.

Anordnung eines Versuches nach der modifizierten Wassermannschen Methode.

	1 ccm aktives $\Sigma$ -Serum 0,2	0,2	0,2	} 1 Stunde binden im Thermostat. bei 37°, dann er- folgt Zusatz von 0,008 ccm Hammelblut- ambozeptor und 1 ccm 2,5-prz. Hammelblut. Das Volumen in jed. Reagenzglas beträgt 4 ccm
	1 ccm $\Sigma$ -Extrakt 0,1	0,5	NaCl	
Resultat:	positiv	positiv	negativ	
	1 ccm aktives Normalser. 0,2	0,2	0,2	
	1 ccm $\Sigma$ -Extrakt 0,1	0,5	NaCl	}
Resultat:	negativ	negativ	negativ	
	1 ccm NaCl	1 ccm		
	1 ccm Luesextrakt 0,1	NaCl		
Resultat:	negativ	negativ		

1) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 47.

2) Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 50.

## II.

Anordnung eines Versuches nach der **ursprünglichen Wassermannschen Methode.**

	1 ccm inaktiv. Luesser. 0,2	0,4	1 Stunde binden im Thermostaten, dann erfolgt Zusatz von 0,00025 ccm Hammelblutambo- zeptor und 1 ccm 5-proz. Hammel- blut. Das Volumen in jedem Reagenz- glas beträgt 5 ccm
	1 ccm Luesextrakt 0,25	NaCl	
	1 ccm M.-Komplement 0,1	0,1	
Resultat:	positiv	negativ	
	1 ccm inaktiv. Normalser. 0,2	0,4	
	1 ccm Luesextrakt 0,25	NaCl	
	1 ccm M.-Komplement 0,1	0,1	
Resultat:	negativ	negativ	
	1 ccm NaCl		
	1 ccm Luesextrakt 0,25		
	1 ccm M.-Komplement 0,1		
Resultat:	negativ		

Der zu den Versuchen verwendete Luesextrakt stammte aus der Leber eines syphilitischen Foetus, er ist in der bekannten Weise mit Alkohol absolut. hergestellt, und zwar 1 Teil Organ auf 9 Teile Alkohol absolut.

Aus dem Protokoll geht hervor, daß das aktive menschliche Serum für den Versuch in der gleichen Konzentration wie früher, genommen wird, nur mit dem Unterschiede, daß man für die Kontrolle nicht mehr die doppelte, sondern nur die einfache Dosis verwendet. Für den Fall, daß das zu untersuchende Serum nicht für den ganzen Versuch in der oben angeführten Weise reicht, kann man Röhrchen 2 fortlassen.

Der syphilitische Leberextrakt wird stärker verdünnt als früher und zwar nehme ich für die stärkere Konzentration  $\frac{2}{5}$ , für die schwächere Konzentration  $\frac{1}{5}$  der mit inaktivem Serum angewendeten Dosis. Beide Konzentrationen bewirken allein die Lösung von 1 ccm 2,5-proz. Hammelblutkörperchen. Wie weiter aus dem Protokoll zu ersehen ist, benutze ich für meine Technik einen etwa dreimal so starken hämolytischen Ambozeptor wie für die Versuchsanordnung mit Meerschweinchenkomplement, für die — entsprechend dem täglichen Vorversuch — die 3—4mal komplett lösende Dosis für 1 ccm 5-proz. Hammelblut angewendet wird. Ich nehme das Hammelblut für die Versuche mit aktivem Menschenserum in der halben Konzentration (2,5-proz.). Trotz des hohen Gehaltes an Ambozeptor und trotz der schwächeren Konzentration des Hammelblutes arbeite ich nur mit 1—2 Komplement- bzw. Ambozeptoreinheiten, wie in nachfolgender Tabelle veranschaulicht ist.

Tabelle II.

Versuchsprotokoll vom 7. Dez. mit aktiven Seren und gleichzeitiger Aus-  
titration der untersuchten Sera auf ihr eigenes Komplement.

	Versuch				Komplement- gehalt des Serums
1.	$\Sigma$ aktiv. Ser. (5622) 1 ccm 0,2 $\Sigma$ Extrakt 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl		
	1 Stunde binden, dann 1 ccm 0,08-proz. hämolyt. Ambozeptor und 1 ccm 2,5-proz. Hammelblut				
Resultat:	Hemmung	Hemmung	Lösung	1 Komplement- einheit	
2.	Akt. verdächt. Ser. (5636) 1 ccm 0,2 $\Sigma$ Extrakt 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl		
	wie oben				
Resultat:	Lösung	Lösung	Lösung	1 Komplement- einheit	
3.	$\Sigma$ aktiv. Ser. (5630) 1 ccm 0,2 $\Sigma$ Extrakt 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl		
	wie oben				
Resultat:	Hemmung	Hemmung	Lösung	2 Komplement- einheiten	
4.	$\Sigma$ lat. aktiv. Ser. (5626) 1 ccm 0,2 $\Sigma$ Extrakt 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl		
	wie oben				
Resultat:	Lösung	Lösung	Lösung	2 Komplement- einheiten	
5.	$\Sigma$ lat. aktiv. Ser. (5635) 1 ccm 0,2 $\Sigma$ Extrakt 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl		
	wie oben				
Resultat:	Lösung	Lösung	Lösung	2 Komplement- einheiten	

	Versuch				Komplement- gehalt des Serums
	Normal. aktiv. Ser. Σ Extrakt	1 ccm 0,2 1 ccm 0,1	0,2 0,05	0,2 NaCl	
6.	wie oben				
Resultat:	Lösung		Lösung	Lösung	1—2 Komple- menteinheiten

Was den Komplementgehalt der menschlichen Sera anbetrifft, so habe ich durch zahlreiche Versuche feststellen können:

1) daß der Gehalt durchaus nicht den großen Schwankungen unterworfen ist, wie man dies bisher anzunehmen gewohnt war, und

2) daß das Komplement auch noch in Seren, die längere Zeit (48 Stunden) gestanden haben oder von auswärts eingesandt worden waren, in der Regel noch in einer Menge vorhanden ist, die zum Versuch völlig ausreicht; selbst Leichensera konnte ich verschiedene Male in aktivem Zustande untersuchen.

Die Hämolyse tritt im Versuch bei aktiven Seren im allgemeinen schneller ein, als bei inaktiven Seren, und die Lösung der Kontrollen und der nicht gehemmten Versuchsröhrchen beginnt häufig schon, ehe der Versuch in den Thermostaten gestellt werden konnte. Der Versuch steht so lange bei 37° im Thermostaten, bis die Kontrollen gelöst sind, was meist schon nach  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Stunde der Fall ist. Er bleibt dann bei Zimmertemperatur noch 1— $1\frac{1}{2}$  Stunden stehen und wird von Zeit zu Zeit kontrolliert, ob nachträgliche Lösungen erfolgen. Röhrchen, die sich vollkommen oder sehr stark nachgelöst haben, werden als **negativ** angesehen, selbst wenn sie zur Zeit der vollkommenen Lösung des betreffenden Serums allein noch vollständig gehemmt waren. Eine geringe Nachlösung (große Kuppe), selbst in der stärkeren Konzentration (0,1 Extrakt), wird als **positiv** ge-

rechnet. — Ich habe mich überzeugt, daß die Sera, die im Anfang vollkommene Hemmung zeigten (bei Lösung ihrer Kontrolle), bei denen aber nachträglich noch Lösung eintrat, meist von alten syphilitischen Fällen stammten. Da es aber — wenn auch sehr selten nach meinen bisherigen Erfahrungen — vorkommt, daß auch normale Sera — bei Lösung ihrer Kontrollen — leichte Hemmungen der Hämolyse (kleine Kuppe bis Kuppe) aufweisen können, bin ich zu der ob angeführten strengen Beurteilung der Resultate gekommen.

Ich hatte bis zum Beginn der Zusammenstellung der Statistik im ganzen 300<sup>1)</sup> Sera untersucht. Von den 300 Seren waren 273 Sera aus Breslau und stammten aus den verschiedenen Kliniken, Hospitälern, von Dermatologen und praktischen Aerzten. Nur in 3 Fällen war ich nicht in der Lage, das Serum nach meiner Technik untersuchen zu können, da es kein Komplement enthielt. Ob sich das Komplement in den Seren, die, meist nicht über 48 Stunden alt, zur Untersuchung kamen, nicht gehalten hat, oder ob sie überhaupt komplementlos waren, konnte ich nicht entscheiden. Detre und Brezowsky<sup>2)</sup> sprechen ihre Bedenken aus, die gewiß theoretisch ganz gerechtfertigt sind, gegen die Untersuchungen mit aktiven Seren wegen des an sich schwankenden Komplementgehaltes derselben und weisen darauf hin, daß durch einzelne, hauptsächlich konsumierende Krankheiten der Komplementgehalt der Sera sich zu vermindern pflegt. Für die Praxis fallen aber, wie meine Untersuchungen zeigen, die Bedenken fast völlig fort. Es ist allerdings ratsam, wenn man nur wenig von einem schwer zu erlangenden Serum hat, dieses dann nach der ursprünglichen Methode zu prüfen. — Von 39 von auswärts eingesandten Seren, unter denen sich Sera aus Memel, Danzig, Lodz etc. befanden und die ohne jede besondere Kautelen versandt worden waren, konnte ich 30 Sera frisch untersuchen; bei 9 war es wegen Komplementmangel nicht möglich.

Zweimal hatte ich Gelegenheit, ganz frische Lumbalflüssigkeiten und einmal eine Ascitesflüssigkeit zu untersuchen,

1) eine Zahl, die seitdem beträchtlich vermehrt worden ist, da die Versuche immer weiter fortgesetzt worden sind und noch werden.

2) Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 49.

doch fand ich bei diesen Flüssigkeiten im Gegensatz zum Blutserum kein Komplement.

Bei der Prüfung der 300 Seren aus Breslau, von denen ich nur 2 wegen Komplementmangels nicht aktiv untersuchen konnte, überzeugte ich mich, daß das Komplement des menschlichen Serums kein so labiler Körper ist, daß eine sofortige Untersuchung der Sera bedingt ist. Das Komplement hält sich, wenn das Serum im Eisschrank aufbewahrt wird, 2 bis 3 Tage<sup>1)</sup>.

Wenn ich nun zu den mit meiner Technik erzielten **Resultaten** übergehe, so ergibt sich folgendes:

Meine Versuche, die sich bis jetzt auf 300 Sera erstrecken und noch weiter fortgesetzt werden, wurden in folgender Weise gehandhabt. Die Sera, die ich meist nach 24—48 Stunden nach der Entnahme bekam, wurden gleichzeitig sowohl nach der eben beschriebenen Technik wie nach der ursprünglichen (inaktiv mit Meerschweinchenkomplement) untersucht. Die erhaltenen Resultate beider Methoden gehen aus der folgenden Tabelle über die untersuchten Sera hervor.

Tabelle III.

Uebersicht über die nach der Wassermann-Neisser-Bruckschen Methode untersuchten 300 Sera

A. mit Anwendung von Menschenkomplement (Modifikation Stern).

	Gesamt- zahl	Positiv	Negativ	Reaktion + in Proz.
Syphilitische Fälle und syphilis- verdächtige Fälle	244	130	114	53,3
Normale Sera	56	—	56	100

B. mit Anwendung von Meerschweinchenkomplement (ursprüngliche Methode).

	Gesamt- zahl	Positiv	Negativ	Reaktion + in Proz.
Syphilitische Fälle und syphilis- verdächtige Fälle	244	94	150	38,5
Normale Sera	56	—	56	100

1) Vielleicht bewährt sich hierbei die Friedbergersche Angabe, das Komplement im Serum durch Zusatz von NaCl zu konservieren. Versuche darüber sind im Gange.

Während es mit der ursprünglichen Technik nur gelang, in 38,5 Proz. aller syphilitischen und syphilitisch verdächtigen Fälle positive Wassermannsche Reaktion zu erzielen, war das mit der modifizierten Methode in 53,5 Proz. der Fall. 56 normale Sera waren mit beiden Untersuchungsarten negativ.

Wenn wir uns näher ansehen, was für Fälle es waren, in denen die Resultate der beiden Methoden differierten, so ergibt sich folgendes:

Tabelle IV.

Uebersicht über alle Fälle (36), die nach der ursprünglichen Versuchsanordnung von Wassermann-Neisser-Bruck negativ, nach der modifizierten positiv reagierten.

	Normale	0
Sichere Syphilis	{ Lues I	6
	{ Lues II	10
	{ Lues III	2
	{ Lues latens, früher sichere Lues	12
	{ Lues cerebrospinalis	2
Syphilis-Verdacht	{ Mit späterer Diagnose	{ A. Primäraffekt 2
		{ B. Exanthem 4
	{ Bisher unaufgeklärt	4

Im ganzen gaben 36 Fälle nach der modifizierten Wassermannschen Methode ein positives Resultat, während sie nach der ursprünglichen negativ waren. Darunter sind 32 Fälle von sicherer Syphilis, und zwar 6 Primäraffekte, 10 Fälle von Lues II, 2 Fälle von Lues III, 2 Fälle von Lues cerebrospinalis und 12 Fälle von Lues latens mit früherer sicherer Lues, meist ohne augenblickliche Erscheinungen. Bei 6 Patienten konnte die Diagnose zu einer Zeit gestellt werden, zu der klinisch noch nichts nachweisbar war, und zwar sind das folgende Fälle:

Bei No. 1 und 2, die uns vom städtischen Hospital zugesandt worden waren, bestätigten die später auftretenden Primäraffekte die Richtigkeit der Serumdiagnose. Der dritte Fall betraf einen Studenten, bei dem erst 6 Wochen nach dem positiven Ausfall der Serumreaktion eine typische spezifische Alopecie festgestellt wurde. Von dem vierten fraglichen Falle wurde uns das Serum zur Untersuchung von auswärts gesandt, und wir hörten einige Wochen später, daß sich bei dem



Patienten Exanthem herausgestellt habe. Auch bei den beiden letzten Fällen traten einige Zeit nach der Blutuntersuchung typische Exantheme auf.

Die Zahl der lues-verdächtigen Fälle, ohne bisher bestätigte Diagnose, beträgt 4; es ist aber keiner dabei, bei dem Syphilis gänzlich ausgeschlossen ist.

No. 1 ist ein Patient, der uns von einem hiesigen Krankenhaus mit der Differenzialdiagnose: Tuberkulose oder Syphilis? zugeschickt wurde. Wir wurden nachträglich unterrichtet, daß Tuberkelbacillen gefunden worden sind, der Fall aber sehr verdächtig für Lues sei und als Mischinfektion angesehen werde.

No. 2 ist eine Arteriosklerose, bei der ein positives Resultat nach den Befunden von Citron u. a. nichts Auffälliges ist.

No. 3 ist das Serum einer Frau, die zwar zurzeit keine Symptome, die für Lues sprechen, zeigt, deren 5 Wochen altes Kind aber an Lues hereditaria leidet.

No. 4 ist ein Patient aus der Nervenlinik mit der Diagnose: Lues cerebri, bei welchem eine Injektionskur eingeleitet worden ist und über den ich später berichten werde.

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich also, daß in der übergroßen Mehrzahl der Fälle bei der Ausführung der Wassermann-Neisser-Brückschen Reaktion das Meerschweinchenkomplement wegfallen kann und durch das eigene Komplement des zu untersuchenden Menschenserums zu ersetzen ist. Eine Untersuchung unmittelbar nach der Blutentnahme ist bei der von mir gewählten Technik nicht einmal notwendig. Wir ersehen aber aus meinen Resultaten nicht nur, daß die Möglichkeit vorhanden ist, das Menschenkomplement bei der Wassermannschen Reaktion zu benutzen, sondern auch, daß sich durch meine Technik **die Schärfe der Reaktion noch vergrößert**, ohne daß dieselbe ihres für Syphilis charakteristischen Wesens entkleidet wird.

Warum die Ausschläge bei Verwertung des eigenen Komplementes feiner werden, läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden. Es läge auf der Hand, anzunehmen, daß bei Anwendung des Meerschweinchenkomplementes in der üblichen

Dosis von 0,1 ein derartiger Komplementüberschuß in dem ganzen System vorhanden ist, daß — noch dazu durch die Wirkung des starken Ambozeptors — der Ausschlag eines schwächer positiven Luesserums verdeckt wird. Bauer hat ja auf Grund dieser Ueberlegungen vorgeschlagen, den schwächeren Ambozeptor des menschlichen Serums zur Anstellung der Wassermann-Neisser-Bruckschen Reaktion zu benutzen. Er und Hinrichs sahen bei dieser Technik ebenfalls feinere Ausschläge, besonders in latenten Luesfällen — eine Angabe, die Meirowsky an unserer Abteilung bestätigen konnte. — Daß aber der geringere Komplementgehalt nicht allein an der Verschärfung der Reaktion schuld ist, geht aus den folgenden Versuchen hervor.

Unmittelbar anschließend an den serodiagnostischen Versuch, der bei 2 Seren mit Meerschweinchenkomplement ein negatives, mit dem eigenen Menschenkomplement ein positives Resultat gezeigt hatte, titrierte ich sowohl die beiden Seren als auch das Meerscheinchenserum, das ich verwendet hatte — natürlich mit derselben Ambozeptor- und Blutmenge — aus und erhielt folgende Werte:

Meerschweinchengkomplement	0,1	0,05	0,025	0,01
Lösung		Lösung	Lösung	Hemmung
I. Menschenserum	0,1	0,05	0,025	0,01
Lösung		inkompl. Lösung	Hemmung	Hemmung
II. Menschenserum	0,1	0,05	0,025	0,01
Lösung		inkompl. Lösung	Hemmung	Hemmung

Da ich im vorangegangenen Versuch mit 0,05 ccm Meerscheinchenserum und 0,2 ccm Menschenserum gearbeitet hatte, so ergibt sich aus dem Protokoll, daß das Meerschweinchenkomplement nicht nur nicht stärker, sondern eher schwächer als das Menschenkomplement war. Wenn ich trotzdem mit dem Menschenkomplement in einer Anzahl von Fällen, die mit Meerschweinchenkomplement negativ waren, ein positives Resultat erhielt, so kann die Verfeinerung der Wassermannschen Reaktion nicht allein dem bei der beschriebenen Technik in Anwendung kommenden geringeren Komplementgehalt zugeschrieben werden, sondern es müssen

durch die Ausschaltung jedes tierischen Serums (der stark verdünnte Hammelblutambozeptor kommt hierbei kaum in Betracht) bei der Reaktion gewisse, freilich noch unbekannte, Faktoren in Wegfall kommen, die zuweilen die Schärfe des Ausschlages zu trüben geeignet sind.

Im Anschluß an die vorstehenden Versuche habe ich eine Anzahl von Seren, die gleichzeitig 1) nach der ursprünglichen Wassermannschen Methode und 2) der Bauerschen Modifikation geprüft wurden, außerdem noch 3) mit der Wassermannschen Methode, aber mit Zusatz von 0,05 Komplement, 4) nach der Hechtschen und 5) nach meiner Versuchsanordnung untersucht, so daß jedes Serum gleichzeitig nach 5 bzw. 4<sup>1)</sup> verschiedenen Arten geprüft wurde. Die Resultate der Untersuchung zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle V.

Anstellung der Wassermann-Neisser-Bruckschen Reaktion mit syphilitischen oder syphilisverdächtigen Seren nach 5 bzw. 4 verschiedenen Versuchsanordnungen.

No. des Serums	A. Ursprüngliche Methode (Wassermann)		B. Prüfung mit Benutzung des Ambozeptors und Komplementes des untersuchten Menschenserums (Hecht)	C. Prüfung mit Benutzung des Komplementes des untersuchten Menschenserums und des künstlichen Ambozeptors gegen Hammelblut (Stern)	D. Prüfung mit Fortlassen des künstlichen Hammelblut-Ambozeptors (Bauer)	Klinische Diagnose
	a) mit 0,1	b) mit 0,05				
	Meerschweinchenkomplement					
1 5832	0	0	+	+	K	Σ
2 5833	+	+	+	+	+	Σ
3 5835	+	+	+	+	K	Σ II
4 5836	+	+	+	+	+	Σ II
5 5844	0	0	0	0	0	Σ-Verdacht
6 5840	0	0	0*	0	K	Σ-Verdacht
7 5841	+	+	+	+	+	Σ
8 5843	0	0	0*	0	K	Σ?
9 5851	0	0	0	0	0	Normal
10 5853	+	+	+	+	+	Σ lat.
11 5854	0	0	0	0	0	Σ lat.

1) Eine Anzahl Sera konnte nicht nach der Bauerschen Technik untersucht werden, die ja aber genügend durch die Arbeit Meierowskys berücksichtigt worden ist.

	No. des Serums	A. Ursprüngliche Methode (Wassermann).		B. Prüfung mit Benutzung des Ambozeptors und Komplementes des untersuchten Menschenserums (Hecht)	C. Prüfung mit Benutzung des Komplementes des untersuchten Menschen-serums und des künstlichen Ambozeptors gegen Hammelblut (Stern)	D. Prüfung mit Fortlassen des künstlichen Hammelblut-Ambozeptors (Bauer)	Klinische Diagnose
		a) mit 0,1	b) mit 0,05				
		Meerschweinchenkomplement					
12	5855	+	+	+	+	+	Σ II
13	5858	0	0	0	0	0	Σ-Verdacht
14	5852	+	+	+	+	+	Σ II
15	5866	+	+	+	+	+	Σ
16	5873	0	0	0	0	0	Σ
17	5874	0	0	0*	0	0	Σ
18	5875	0	0	0	0	0	Σ-Verdacht
19	5876	0	0	0	0	0	Σ-Verdacht
20	5877	+	+	+	+	+	Σ II
21	5878	0	0	0	0	0	Σ II
22	5880	0	0	0	0	0	Σ?
23	5899	0	0	0	0	0	Σ?
24	5900	0	0	K*	+	K	Σ, 1. Kur vor Jahren
25	5901	0	0	0*	0	0	Σ I
26	5902	0	+	+	+	K	alte Σ
27	5906	0	0	0	0	0	Σ?
28	5908	0	0	0	0	0	Σ?
29	5910	+	+	+	+	+	Σ II
30	5925	0	0	0*	0	K	keine Σ
31	5926	0	0	K*	K	0	Σ?
32	5930	0	0	0	0	0	Σ?
33	5938	0	0	+	0	0	klinisch keine Σ
34	5949	+	+	+	+	+	Σ III
35	5950	+	+	+	+	+	Σ II
36	5951	0	0	0	0	0	Σ?
37	5966	+	+	+	+	+	Σ
38	5962	0	+	+	+	0	alte Σ
39	5983	0	0	0	0	0	Σ spät latent
40	5967	0	0	0	0	0	Σ?
41	5968	0	+	+	+	0	alte Σ, jetzt Leukoderm
42	5971	0	0	K*	0	0	normal
43	6008	0	0	K*	0	K	Σ?
44	6010	0	0	0	0	0	Σ?
45	6007	+	+	+	+	+	Σ
46	6031	0	0	0	0	0	Σ lat.
47	6032	0	0	0	0	0	Σ
48	6033	0	0	0	0	0	Σ I
49	6034	0	0	K*	0	K	Σ
50	6035	+	+	+	+	+	alte Σ
51	6036	+	+	K*	+	K	Σ II
52	6037	0	0	K*	+	0	Kerat. parench.
53	6038	+	+	K*	+	K	Σ
54	6039	+	+	+	+	+	Σ?

	No. des Serums	A. Ursprüngliche Methode (Wassermann).		B. Prüfung mit Benutzung des Ambozeptors und Komplementes des untersuchten Menschenserums (Hecht)	C. Prüfung mit Benutzung des Komplementes des untersuchten Menschen-serums und des künstlichen Ambozeptors gegen Hammelblut (Stern)	D. Prüfung mit Fortlassen des künstlichen Hammelblut-Ambozeptors (Bauer)	Klinische Diagnose
		a) mit 0,1	b) mit 0,05				
		Meerschweinchenkomplement					
55	6041	0	0	0*	0	0	Σ II
56	6043	+	+	+	+	+	Σ?
57	<b>6044</b>	0	0	+	+	0	Σ II
58	6046	+	+	+	+	+	Σ
59	6053	+	+	+	+	+	Σ
60	6054	0	0	0*	0	K	Σ?
61	6055	0	0	0*	0	0	Σ?
62	<b>6056</b>	0	0	+	+	0	Σ?
63	6057	0	0	0*	0	0	Tabes?
64	6058	0	0	0*	0	K	Σ?
65	<b>6059</b>	0	+	+	+	0	Care. od. Σ III?
66	<b>6060</b>	0	0	+	+	0	Σ? Noch nicht aufgeklärt. Fall
67	6061	+	+	+	+	+	Σ
68	<b>6062</b>	0	+	+	+	0	Σ lat.
69	<b>6060</b>	0	0	+	+	0	Σ vor 16 Jahren
70	6091	+	K	K	K	+	Σ?
71	6087	+	+	+	+	+	Σ
72	6086	+	+	+	+	+	Σ
73	5859	+	+	+	+	—	Σ
74	5879	+	+	+	+	—	Σ
75	5892	+	+	+	+	—	Σ II
76	5903	0	0	0*	0	—	Σ-Verdacht
77	<b>5907</b>	0	0	+	0	—	Σ II
78	5909	Q	0	0	0	—	Σ?
79	5941	+	+	+	+	—	Σ I
80	5942	0	0	0	0	—	Σ?
81	5930	+	+	+	+	—	Σ
82	<b>5945</b>	0	0	+	+	—	Σ lat.
83	5946	0	0	0	0	—	Σ
84	5947	0	0	0	0	—	Σ-Verdacht
85	5948	+	+	+	+	—	Σ II
86	5956	0	0	0	0	—	Σ?
87	6009	0	0	K*	0	—	Σ lat.
88	<b>6042</b>	0	0	+	+	—	Σ maligna
89	6045	+	+	+	+	—	alte Σ
90	<b>6062</b>	0	0	+	0	—	Σ cerebri?
91	6088	0	0	0	0	—	Σ?
92	6089	0	0	K*	0	—	Σ?
93	<b>6085</b>	0	0	+	+	—	frische Σ

Die Differenzen der Resultate bei den verschiedenen Versuchsanordnungen sind durch fetten Druck der Serum-Nummer in der vorstehenden Tabelle hervorgehoben worden. Die Sternchen neben den

Resultaten der Hechtschen Technik bezeichnen, daß nachträglich hämolytischer Ambozeptor, und zwar in der bei meiner Modifikation angewandten Konzentration, zugefügt werden mußte, da der natürliche Ambozeptor des Serums nicht ausreichte. „K“ im Protokoll bedeutet, daß das Komplement im betreffenden Versuch nicht ausreichte und daher kein Resultat registriert werden konnte.

Es wurden 93 Sera nach 5 bzw. 4 Versuchsanordnungen geprüft; übereinstimmend in allen Techniken verhielten sich 60 Sera, und zwar waren 28 Sera positiv und 32 Sera negativ. Die Resultate der 33 übrigen Seren differieren in den einzelnen Versuchsanordnungen, und zwar in folgender Weise:

Tabelle VI.

	Positiv	Negativ	Kein Resultat wegen Komplementmangels der untersucht. Sera
A. Ursprüngliche Methode (Wassermann)			
a) mit 0,1 Meersch.-Komplem.	4	29	0
b) mit 0,05 „	8	24	1
B. Modifikation Hecht	17	5	11
C. „ Stern	18	13	2
D. „ Bauer	1	13	12

Wir ersehen aus der vorstehenden Zusammenstellung, daß ich die meisten positiven Resultate mit meiner Versuchsanordnung erhalten habe.

Was nun die Hechtsche Technik anbetrifft, so kann sie unter Umständen noch positive Resultate geben in Fällen, in denen die meinige versagt. Trotzdem ist sie für die Praxis nicht geeignet, da sehr häufig der hämolytische Ambozeptor des zu untersuchenden Serums nicht ausreicht und man trotz nachträglichem Zusatz von künstlichem hämolytischen Ambozeptor kein Resultat erhält, während man bei Zusatz desselben Ambozeptors von Anfang an (zugleich mit dem Hammelblut) bei denselben Seren fast stets klare, einwandfreie Resultate bekommt. Ich halte es auch für bedenklich, bei Untersuchungen, die, wie wir wissen, durch sehr viele bekannte und vielleicht noch unbekannte Fehlerquellen erschwert werden, mit dem Minimum von Ambozeptor zu arbeiten.

Tabelle VII.

Die Resultate der Sera, die sich nach der Wassermannschen Methode mit 0,1 Meerschweinchenkomplement und der Bauerschen Technik, soweit letztere mitgeprüft wurde, negativ verhielten, aber mit einer oder der anderen der übrigen Versuchsanordnungen positiv reagierten, verteilen sich auf die Wassermannsche Methode mit 0,05 Komplement, auf die Hechtsche und meine eigene Modifikation folgendermaßen.

No. des Serums	A. Ursprüngl. Methode (Wassermann) mit 0,05 Komplement	B. Modifikat. Hecht	C. Modifikat. Stern	Klinische Diagnose der untersuchten Fälle
15832	0	+	+	Alte Syphilis
25900	0	0	+	Sichere Syphilis, erste Kur vor 16 Jahren
35902	+	+	+	Alte, gut behandelte Syphilis
45938	0	+	0	Klinisch: keine Syphilis
55962	+	+	+	Syphilis vor ca. 14 Jahren
66037	0	0	+	Syphilis? Noch nicht aufgeklärter Fall
76044	0	+	+	Syphilis II
85968	+	+	+	Alte Syphilis, jetzt Leukoderm
96056	0	+	+	Nervenfall. Ehemann der untersuchten Frau gibt seinerseits Syphilis zu
106059	+	+	+	Carcinom oder Syphilis III? Erscheinungen sind auf Jodkali zurückgegangen
116060	0	+	+	Osteomyelitis, unaufgeklärter Fall
126062	+	+	+	Syphilis latens
136080	0	+	+	Syphilis vor 16 Jahren
145907	0	+	0	Syphilis II nach der ersten Kur
155945	0	+	+	Syphilis latens
166042	0	+	+	Syphilis maligna
176082	0	+	0	Klinisch Syphilis cerebri, wenn auch anamnestisch ohne Anhaltspunkte
186085	0	+	+	Frische Syphilis
196009	0	K	0	Syphilis latens
206089	0	K	0	Syphilisverdacht

Wie aus der vorstehenden Tabelle hervorgeht, sind fast alle Fälle, die nach meiner Technik positiv waren, klinisch als Syphilis, meist als latente Syphilis diagnostiziert; 2 Fälle sind noch unaufgeklärt, und nur in einem Falle ist die Syphilis sehr zweifelhaft, obwohl allerdings der Ehemann der Kranken seinerseits Syphilis zugab (No. 9, Serum 6056). Die Patientin ist inzwischen verstorben, und die Sektion, die sich allerdings nur auf Gehirn und Rückenmark erstreckte,

ergab: tuberkulöse eitrige Meningitis. Es liegt nahe, bei diesem Falle daran zu denken, daß hier das positive Ergebnis der Serumreaktion nicht als spezifisch aufzufassen ist. Es geht aus den Versuchen der v. Noordenschen Klinik hervor, daß progressive Tuberkulosen, Carcinome etc. unter Umständen gewisse Komplementbindungen geben können. Da nun meine Modifikation der Wassermannschen Reaktion feiner ist, als die ursprüngliche Methode, so könnte man daran denken, daß diese halben Hemmungen in totale Hemmungen umschlagen. In der Tat habe ich bei einer progressiven Tuberkulose, die 4—5 Tage später zur Sektion kam, und einem Lungengangrän positive Serumreaktion erhalten. Die Verfeinerung der alten Versuchsanordnung ist daher kontraindiziert bei allen schweren konsumierenden Krankheiten. Die Beobachtung dieses Momentes ist also für den inneren Kliniker von Wichtigkeit, für den Dermatologen dürfte diese Situation zu den größten Seltenheiten gehören.

#### Zusammenfassung.

Aus den Versuchen geht hervor, daß das Fortlassen des Meerschweinchen-Komplementes und die Benützung des in dem zu untersuchenden menschlichen Serum vorhandenen Komplementes nicht nur praktisch durchführbar ist, sondern auch — natürlich unter Berücksichtigung der auch bei der bisher üblichen Versuchsanordnung zu vermeidenden Fehlerquellen — eine nicht unwesentliche Verfeinerung der Methode bedeutet.

---

Herrn Geheimrat Neisser spreche ich für sein Interesse an der vorstehenden Arbeit und ihre Förderung, Herrn Dr. Bruck für seine Ratschläge meinen ergebensten Dank aus.

---



[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitals in Wien.]

## Ueber das Verhalten des Staphylolysins beim Erwärmen.

Von Dr. **Karl Landsteiner** und Dr. **Rudolf von Rauchenbichler**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Jan. 1909.)

Nach den vorliegenden Angaben werden bakterielle Hämotoxine in der Regel schon durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erwärmen auf  $60^{\circ}$  unwirksam<sup>1)</sup>. Immerhin sind eine Anzahl von hämolytischen Stoffen bakterieller Herkunft gefunden worden, z. B. in Kulturen des *Bac. pyocyaneus*, *Bact. coli*, *typhi*, *dysenteriae*, die gegen Wärme beträchtlich resistenter sind; aber gerade deshalb nahm man öfters an, daß diese Stoffe keine echten Hämotoxine seien<sup>2)</sup>.

Ein auffallendes Verhalten bei der Erwärmung ist auch bei unzweifelhaften Hämotoxinen schon bemerkt worden. Die erste derartige Beobachtung stammt von Dreyer und Jex Blake<sup>3)</sup> und wurde am Hämotoxin des *Bac. megatherium* gemacht. Diese Autoren fanden, daß das Lysin zwar durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erwärmen auf  $60^{\circ}$  unwirksam wird, aber, wenn man es dann weiter durch 10' auf  $100^{\circ}$  erhitzt, einen ansehnlichen Teil seines ursprünglichen hämolytischen Titors wiedergewinnt. Wurde das Megatheriolysin bis zu einer Temperatur von  $100^{\circ}$  erhitzt, so verlor es  $\frac{5}{6}$  seiner Wirksamkeit, war aber nach weiterer 10' langer Einwirkung dieser Temperatur wieder stärker und erreichte  $\frac{2}{5}$  des ursprünglichen Wertes. Eine Erklärung des Phänomens vermochten die Autoren nicht zu geben.

Das Staphylolysin wird nach den Beobachtungen von Neisser und Wechsberg<sup>4)</sup> unwirksam, wenn man es 20'

---

1) Vgl. z. B. Madsen in Handb. d. Techn. d. Imm. von Kraus-Levaditi, Bd. 1, p. 47.

2) Vgl. Pflüger, Ueber Bakterienhämotoxine, in Handb. d. path. Mikroorg. von Kolle-Wassermann, Bd. 1, p. 318.

3) Brit. med. Journ., 1904, No. 2280, p. 565; Lancet, 1904, Vol. 2, p. 409.

4) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 36, 1901.

auf 56° erhitzt, während Fränkel und Baumann<sup>1)</sup> unter mehreren geprüften Staphylolysinen zwei fanden, die durch ein Erwärmen auf 88° bzw. 100° ihre blutlösende Wirkung nicht ganz einbüßten. Eine quantitative Auswertung ist nicht mitgeteilt.

Bei Arrhenius<sup>2)</sup> ist eine Angabe über das Staphylolysin zu finden, die ganz der Beobachtung von Dreyer und Jex Blake am Megatheriolysin entspricht. Danach verliert Staphylolysin sein Lösungsvermögen bei 70° zum großen Teil, wird aber durch darauf folgendes 5' langes Erhitzen auf 100° wieder wirksam.

Man konnte denken, daß in der Staphylokokkenbouillon neben dem Lysin eine andere blutlösende hitzebeständige Substanz vorhanden sei, und wirklich fanden wir<sup>3)</sup> und Raubitschek<sup>4)</sup> sowie Mutermilch<sup>5)</sup> früher in Kulturflüssigkeiten verschiedener Bakterien hitzebeständige, in Alkohol lösliche Stoffe, die Blut aufzulösen vermögen. Die Vermutung, daß solche Körper die Ursache des Lösungsvermögens der auf 100° erhitzten Flüssigkeiten seien, trifft aber nicht zu, da Dreyer und Jex Blake beim Megatheriolysin fanden, daß die bei 100° reaktivierten Lösungen durch spezifisches Anti-lysin neutralisierbar sind, eine Beobachtung, die wir für das Staphylolysin bestätigen konnten.

Die erwähnten Beobachtungen schienen uns auffallend genug, um eine nähere Untersuchung wünschenswert zu machen, um so mehr, als das Auftreten des gleichen Phänomens bei zwei verschiedenen Lysinen auf eine allgemeine Bedeutung des Vorganges hinweist.

Das von uns verwendete Lysin ist sehr wirksam und enthält auch ein akut wirkendes Toxin [Kraus und Přibram<sup>6)</sup>]. Es war durch 12-tägiges Wachstum des Staphylococcus bei 37° in einer Bouillon entstanden, die mit  $\frac{1}{3}$  der zur Rötung von Phenolphthalein nötigen Alkalimenge versetzt war, und wurde durch Reichelfilter keimfrei gemacht. Es zeigte die von

1) Münch. med. Wochenschr., 1905, p. 937.

2) Immunochemie, Leipzig, Akad. Verlagsges., 1907, p. 15.

3) Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, p. 660.

4) Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, p. 508.

5) Compt. rend. Soc. d. Biol., T. 65 (1908), p. 359.

6) Wien. klin. Wochenschr., 1906, p. 493.

Arrhenius erwähnte, bis jetzt nicht erklärte Erscheinung in sehr ausgeprägter Weise (Versuch I).

Die Hämolysebestimmungen wurden wie gewöhnlich durch Herstellung einer Reihe von Verdünnungen vorgenommen. Das Volumen der einzelnen Proben betrug 0,5 ccm; in jedes Röhrchen kamen nach Herstellung der Verdünnungsreihe 0,2 ccm 5-proz. gewaschenes Kaninchenblut. Die Proben wurden umgeschüttelt, 2<sup>h</sup> auf 37° gehalten und dann im Eiskasten bis zum nächsten Tag zur Ablesung aufbewahrt.

Die aufgezeichneten Grade der Hämolyse sind: komplett (k.), fast komplett (f. k.), sehr stark (s. st.), stark (st.), deutlich (d.), schwach (schw.) Spur (Sp.), 0. Eine genauere kolorimetrische Bestimmung war für unsere Zwecke überflüssig.

I.

A = natives Lysin, B = Lysin, 30' auf 65° erwärmt, C = Lysin, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

Verdünnungs- grad	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
A	k.	k.	k.	k.	k.	k.	f. k.	f. k.	s. st.	d.	schw.	0
B	d.	d.	d.	d.	0	.	.	.	.	.	.	.
C	k.	k.	k.	k.	f. k.	f. k.	s. st.	st.	Sp.	0	.	.

Setzt man die Erwärmung auf 65° längere Zeit fort, so wird die Inaktivierung vollständiger, die Rückbildung des Lysins tritt trotzdem wieder ein (Versuch II).

II.

A = natives Lysin, B = Lysin, 2 Stunden auf 65° erwärmt, C = Lysin, 2 Stunden auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt. (In diesem Versuche wurde ein Lysin desselben Kokkenstammes, aber von einer anderen Darstellung als in den übrigen Versuchen, benützt.)

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
A	k.	k.	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	st.	Sp.	0	.	.
B	Sp.	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	f. k.	s. st.	s. st.	st.	d.	0	.	.	.	.	.

Das Reaktivierungsphänomen kann mehrmals hintereinander hervorgerufen werden, doch vermindert sich allmählich die Differenz der auf 65° und der auf 100° erhitzten Lösungen, da die Abschwächung bei 65° verhältnismäßig geringer wird, und das Lysin bei der Fortsetzung des Verfahrens im ganzen abnimmt (Versuch III).

## III.

Das aktive Lysin (A) wurde 30' auf 65° gehalten (B), dann 5' auf 100° (C), wieder 30' auf 65° (D), 5' auf 100° (E) und so fort (F, G, H, J).

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
A	k.	k.	k.	k.	k.	k.	s. st.	st.	schw.	Sp.	0
B	schw.	schw.	0	.	.	.	.	.	.	.	.
C	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	st.	d.	0	.	.	.	.
D	s. st.	s. st.	d.	0	.	.	.	.	.	.	.
E	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	schw.	0	.	.	.	.
F	s. st.	s. st.	st.	schw.	0	.	.	.	.	.	.
G	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	d.	schw.	0	.	.	.	.
H	s. st.	s. st.	schw.	0	.	.	.	.	.	.	.
J	s. st.	s. st.	st.	d.	0	.	.	.	.	.	.

Einen Hinweis auf das Wesen des Vorganges erhielten wir bei der Prüfung des Verhaltens von Lysin, das mit 1-proz. Kochsalzlösung verdünnt war. Im Gegensatz zu den mitgeteilten Versuchen, in denen konzentriertes Lysin der Erhitzung unterworfen wurde, ist bei der Erwärmung von verdünntem Lysin auf 65° und dann auf 100° die Erscheinung der Inaktivierung und darauf folgenden Restitution weniger deutlich oder bleibt ganz aus (Versuch IV, V).

## IV.

A = mit Kochsalzlösung auf das 10-fache verdünntes Lysin, 30' auf 65° erwärmt, B = dieselbe Verdünnung, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	10	20	40	80	160	320	640	1280
A	s. st.	s. st.	s. st.	st.	schw.	0	.	.
B	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	st.	d.	Sp.	0

## V.

A = mit Kochsalzlösung auf das 100-fache verdünntes Lysin, 30' auf 65° erwärmt, B = dieselbe Verdünnung, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	100	200	400	800	1600
A	s. st.	s. st.	d.	schw.	0
B	s. st.	s. st.	d.	schw.	0

Diese Versuche sprachen dafür, daß die Eigenschaft, durch Erwärmen auf 100° wirksam zu werden, nicht dem Hämotoxin als solchem zukommt, denn es wäre schwer zu verstehen, warum dann verdünnte Lösungen sich nicht ebenso verhalten sollten wie konzentrierte. Zunächst konnte daran gedacht werden, daß die Bestandteile der Nährbouillon

sich an dem Prozeß beteiligen, aber dieser Annahme entsprachen unsere Versuche nicht, denn Verdünnungen des Lysins mit Bouillon (oder 1-proz. Peptonlösungen) zeigten das gleiche Verhalten wie Kochsalzverdünnungen, und das eigenartige Reaktivierungsphänomen trat nicht ein, auch wenn die Reaktion der als Verdünnungsmittel dienenden Bouillon innerhalb ziemlich weiter Grenzen geändert wurde<sup>1)</sup>. Demnach war es wahrscheinlich, daß ein neben dem Hämotoxin in der Kulturflüssigkeit vorhandener, von den Staphylokokken produzierter Stoff an dem Vorgange mitwirke. Der Nachweis für diese Annahme ließ sich dadurch erbringen, daß wir das gewöhnlich verwendete Lysin einmal mit 1-proz. NaCl-Lösung so weit verdünnten, daß das Reaktivierungsphänomen nicht mehr deutlich war, und in einem parallel angestellten Versuch die Verdünnung statt mit Kochsalzlösung mit einem unverdünnten, nur ganz schwach hämolytisch wirkenden Staphylokokkenfiltrat (Reichelfilter) vornahmen. Wir verwendeten zur Herstellung dieses Filtrates einen anderen, zwar pathogenen (aus Abszeßteiler gezüchteten), aber nur schwach hämolytischen Staphylokokkenstamm und ließen ihn 12 Tage lang in Bouillon bei 37° wachsen. Zur Kontrolle nahmen wir auch noch eine Verdünnung mit Bouillon vor, die dieselbe Alkaleszenz hatte wie das Filtrat des Abszeßstammes. Ein zweiter Versuch wurde so angestellt, daß das zur Verdünnung dienende Filtrat des Stammes Abszeß vorher eine halbe Stunde auf 55° erwärmt wurde und dadurch seine hämolytische Wirksamkeit bis auf Spuren verlor. (Nach starker Erwärmung, z. B. einstündiger Einwirkung von 100°, scheinen die für die Reaktion notwendigen Stoffe zerstört zu werden.)

VI.

A = Filtrat Abszeß, B = Filtrat Abszeß, 30' auf 65° erwärmt, C = Filtrat Abszeß, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	1	2	4	8	18	32	64
A	st.	d.	d.	schw.	Sp.	0	.
B	0	.	.	.	.	.	.
C	0	.	.	.	.	.	.

1) In Aether lösliche Bestandteile der Kulturfiltrate scheinen ohne Einfluß zu sein, denn durch Ausschütteln mit Aether wurde das Verhalten des Lysins nicht geändert.

D = Lysin mit Filtrat Abszeß, auf das 50-fache verdünnt, E = dieselbe Mischung, 30' auf 65° erwärmt, F = dieselbe Mischung, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800
D	f. k.	f. k.	s. st.	st.	st.	st.	st.	schw.	0
E	0	.	.	.	.	.	.	.	.
F	s. st.	s. st.	d.	schw.	0	.	.	.	.

G, H, J analog wie D, E, F. Verdünnung des Lysins mit dem 50-fachen einer 1-proz. NaCl-Lösung.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800
G	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	s. st.	d.	schw.	0
H	f. k.	f. k.	s. st.	st.	d.	0	.	.	.
J	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	Sp.	0	.	.

K, L, M analog wie D, E, F. Verdünnung des Lysins mit dem 50-fachen von Bouillon.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800
K	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	s. st.	st.	d.	0
L	s. st.	s. st.	s. st.	st.	st.	d.	Sp.	0	.
M	s. st.	s. st.	s. st.	st.	st.	st.	d.	0	.

N, O, P analog wie D, E, F. Verdünnung des Lysins mit dem 50-fachen Filtrat Abszeß, das vorher 30' auf 55° erhitzt war.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 800
N	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	s. st.	st.	d.	0
O	schw.	schw.	Sp.	0	.	.	.	.	.
P	s. st.	s. st.	st.	st.	d.	Sp.	0	.	.

Um auch mit Produkten des gleichen Stammes die Erscheinung hervorzurufen, verdünnten wir das Lysin mit einer Aufschwemmung von Staphylokokkenagarkulturen desselben Stammes. (Oberflächenkultur von 10 Agarplatten gewöhnlicher Größe in 100 ccm 1-proz. NaCl-Lösung). Die Aufschwemmung rief gleich nach der Herstellung die Erscheinung nicht deutlich hervor, wohl aber nach 12-tägiger Autolyse bei 37° unter Toluol. Diese Emulsion wurde durch Papier filtriert und vor dem Versuche noch mit NaCl-Lösung auf das doppelte Volumen

gebracht<sup>1)</sup>. Die Aufschwemmung als solche hatte nur eine ganz geringe hämolytische Wirkung (Versuch VII).

# VII.

A = Autolysierte Staphylokokkenemulsion, B = dieselbe Emulsion, 30' auf 65° erwärmt, C = dieselbe Emulsion, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	1	2	4
A	Sp.	Sp.	0
B	0	.	.
C	0	.	.

D = Lysin, auf das 50-fache mit der autolysierten Aufschwemmung verdünnt, E = dieselbe Mischung, 30' auf 65° erwärmt, F = dieselbe Mischung, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
D	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	Sp.	0
E	Sp.	0	.	.	.	.	.	.	.
F	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	Sp.	0	.	.	.

Zur Kontrolle: G, H, J analog D, E, F. Verdünnung mit 1-proz. NaCl-Lösung.

	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800
G	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	d.	0
H	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	d.	Sp.	0	.	.
J	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	d.	Sp.	0	.	.

Die mitgeteilten Versuche begründen die Ansicht, daß das Lysin sich beim Erwärmen, z. B. auf 65°, mit anderen von den Staphylokokken produzierten Stoffen (vielleicht mit Körpern, die durch Zerfall der Kokken entstehen) zu einer inaktiven Verbindung vereinigen, die bei stärkerem Erhitzen (auf 100°) wieder gespalten wird. Der Prozeß kann ein- oder zweimal wiederholt werden, aber endlich scheinen beide beteiligte Substanzen zerstört zu werden. Das Ausbleiben der Reaktion bei genügender Verdünnung des Lysins mit NaCl-Lösung ist leicht dadurch zu erklären, daß dann die inaktivierende Substanz in zu geringer Konzentration vorhanden ist.

Als inaktivierender Stoff können nicht nur Bestandteile

1) In unverdünntem Zustande bewirkte die Emulsion nach dem Erwärmen eine zu starke Hemmung.

der Staphylokokkenbouillon dienen, denn man kann die gleiche Erscheinung hervorrufen, wenn man das Lysin mit einer Lösung von Serumeiweiß verdünnt<sup>1)</sup>. (Versuch VIII.)

## VIII.

A = Lysin, mit dem 50-fachen Volumen eines mit 1-proz Kochsalzlösung auf das 100-fache verdünnten Pferdeserums gemischt, B = dieselbe Mischung, 30' auf 65° erwärmt, C = dieselbe Mischung, 30' auf 65°, dann 5' auf 100° erwärmt.

	50	100	200	400	800	1600	3200
A	s. st.	s. st.	s. st.	st.	d.	Sp.	0
B	0						
C	k.	f. k.	f. k.	s. st.	d.	Sp.	0

Man sieht, daß das Serum (das bei höherer Konzentration stark antilytisch wirkt) in der angewendeten (durch Vorversuche ermittelten) Verdünnung bei gewöhnlicher Temperatur und Versuchsdauer die Wirkung des Lysins nur wenig beeinträchtigt. Die Hemmung wird aber, ganz wie in den vorher beschriebenen Versuchen, sehr beträchtlich, wenn man das Gemenge 30' auf 65° erwärmt, und die unwirksame Kombination ist durch höhere Erhitzung wieder spaltbar. Der zweite Teil dieses Versuches hat volle Aehnlichkeit mit der von Arrhenius<sup>2)</sup> erwähnten Erscheinung, daß die Verbindung von Staphylolysin mit spezifischem Antilysin durch Erwärmen zerlegbar ist.

Es ist nach dem Vorhergehenden klar, daß das Staphylolysin gegen Erwärmung viel resistenter ist, als man gewöhnlich annahm, und daß die bei etwa 60° rasch eintretende Abschwächung oder Aufhebung der Wirksamkeit nicht auf einer Zerstörung des Hämolysins, sondern auf einem anderen Vorgange beruht. Um das von uns verwendete Lysin wirklich zu zerstören, mußten wir es eine Stunde oder auch noch länger im kochenden Wasserbade halten. Der folgende Versuch (IX) zeigt den Verlauf einer solchen Inaktivierung<sup>3)</sup>.

1) Es ist zu vermuten, daß hier die beginnende Koagulation des Eiweißes eine Rolle spielt.

2) l. c.

3) Nach  $\frac{1}{2}$ -ständiger Erhitzung auf 100° wirkte die Lösung bei subkutaner Injektion auf Kaninchen noch toxisch (kleine Kaninchen starben nach Injektion von 5 cem nach einigen Tagen mit großem Infiltrat an der Injektionsstelle).



## IX.

	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
Lysin unerhitzt	k.	k.	k.	k.	k.	k.	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	schw.	Sp.	0
" 5' auf 100° erwärmt	k.	k.	k.	k.	f. k.	f. k.	f. k.	st.	st.	st.	d.	Sp.	0	.	.
" 15'	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	st.	d.	schw.	0	.	.	.	.
" 30'	f. k.	f. k.	f. k.	s. st.	s. st.	st.	d.	Sp.	0	.	.	.	.	.	.
" 60'	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Aehnliche Verhältnisse wie beim Staphylolysin liegen sehr wahrscheinlich beim Megatheriolysin vor (s. oben); es ist aber gar nicht unwahrscheinlich, daß auch in anderen Fällen, bei Hämolytinen und Toxinen verwandte Vorgänge stattfinden, die keineswegs immer so leicht nachweisbar sein müßten, wie beim Staphylolysin, wenn z. B. die beim Erwärmen primär gebildete inaktive Verbindung eines Toxins zwar bei höherer Temperatur spaltbar ist, gleichzeitig aber schon die Destruktion des Toxins selbst rasch vor sich geht. Die Bildung von Verbindungen der Toxine mit anderen daneben in den Lösungen vorhandenen Stoffen kann vielleicht auch für die Beurteilung der Giftmodifikationen von Bedeutung sein, da es denkbar wäre, daß solche Verbindungen keine oder eine abgeschwächte Giftwirkung hätten, aber doch immunisierend wirkten (sich also ähnlich verhielten wie sogenannte Toxoide).

Die Widerstandsfähigkeit des Staphylolysin gegen Erwärmung läßt sich noch steigern, wenn man dem Lysin Säure zusetzt (Versuch X).

## X.

Staphylolysin wurde mit 0,5 ccm  $\frac{1}{10}$  N-HCl bzw. 0,5 ccm N-HCl versetzt und 1 Stunde im kochenden Wasserbade gehalten. Zum Vergleich wird eine nicht angesäuerte Probe ebenso erhitzt. Vor der Titration werden die Proben neutralisiert und auf gleiches Volumen gebracht.

	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096		
Lysin unerhitzt	k.	k.	k.	k.	k.	k.	f. k.	f. k.	s.	st.	s.	st.	d.	Sp.	0
" ohne Zusatz	d.	schw.	Sp.	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" + 0,5 ccm $\frac{1}{10}$ N-HCl	f. k.	f. k.	f. k.	s.	st.	st.	d.	schw.	Sp.	0	.	.	.	.	.
" pro ccm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" + 0,5 ccm N-HCl	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" pro ccm	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" 1 Std. auf 100° erwärmt	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Aehnliche Beobachtungen verzeichnen Famulener und Madsen<sup>1)</sup> in ihrer Studie über die Abschwächung von Lysinen bei der Erwärmung. Durch den Zusatz einer gewissen Menge von Säure zum Vibriolysin wurde die Geschwindigkeit der Inaktivierung herabgesetzt, nach der Ansicht von Famulener und Madsen wegen der Neutralisierung der die Inaktivierung begünstigenden im Lysin enthaltenen Alkalien. Eine Steigerung des Säurezusatzes über eine gewisse Menge beschleunigt dort wie in unserem Falle die Destruktion des Lysins<sup>2)</sup>.

#### Zusammenfassung.

Staphylolysin ist nicht so leicht durch Erwärmen zerstörbar als man bisher gewöhnlich annahm. Die Inaktivierung bei einer Temperatur z. B. von 65° erfolgt zunächst nicht durch Destruktion des Lysins, sondern durch Bildung einer unwirksamen Verbindung des Lysins mit anderen in den Kulturfiltraten enthaltenen Stoffen. Diese Verbindung läßt sich durch kurzes Erwärmen auf 100° zerlegen und so wird das Lysin zum Teil reaktiviert. Aehnliche Vorgänge können wahrscheinlich auch bei der Inaktivierung anderer Toxine als des Staphylolysin stattfinden.

Erwärmt man Staphylolysin mit einer Menge von normalem Serum, die zu gering ist, um das Lysin unwirksam zu machen, so kann beim Erwärmen Inaktivierung des Lysins durch Bildung einer Verbindung mit Bestandteilen des Serums eintreten. Auch diese Verbindung ist bei höherer Temperatur zerlegbar, so daß wieder Lysin frei wird.

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, p. 186.

2) Durch Zusatz von 0,3 ccm N-HCl zu 1 ccm Staphylolysin entsteht ein Niederschlag, der, obwohl an Menge gering, einen nicht unbedeutlichen Teil des Lysins enthält. Durch Abzentrifugieren und Waschen des Niederschlages erhält man eine gereinigte Lösung des Staphylolysin, deren Eigenschaften wir näher zu untersuchen im Begriffe sind.

# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. I. No. 4.

[Aus dem Imperial Cancer Research, London;  
Direktor: Dr. E. F. Bashford.]

## Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung.

Von E. F. Bashford, J. A. Murray und M. Haaland.

Mit 41 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. Okt. 1908.)

### Erster Teil.

#### Ueber das Wachstum überimpfter Tumoren.

Auf der von den pathologischen Anatomen und den Klinikern gelieferten Grundlage einer eingehenden Kenntnis der Morphologie und des Verlaufes der menschlichen Geschwülste sucht die moderne Krebsforschung durch breit angelegte vergleichend-pathologische Untersuchungen über das Vorkommen des Krebses sowohl in den verschiedenen Menschenrassen als auch im Tierreich, sowie durch systematische experimentelle Erforschung der Tierkrebse weiterzubauen. Hierdurch zeigt sich das Krebsproblem als ein allgemein biologisches, und die aus dem Studium menschlicher Tumoren entstandenen Fragen erscheinen erst hierdurch in ihrer richtigen Perspektive. Daß die Tumoren der kleinen Laboratoriumstiere, insbesondere diejenigen der Maus, mit denen sich die experimentelle Krebsforschung bisher hauptsächlich beschäftigt hat, als echte maligne Geschwülste aufzufassen sind, und daß deswegen den Resultaten der experimentellen Arbeit eine allgemeine Gültigkeit für das Krebsproblem überhaupt zukommt, darf jetzt als allgemein anerkannt werden. Die Uebertragbarkeit dieser Geschwülste ermöglicht, viele Probleme der Krebskrankheit, in die mit morphologischen Methoden nicht weiter eingedrungen werden konnte, von neuen Gesichtspunkten aus anzugreifen. Insbesondere sind unsere Kenntnisse der biologischen Eigen-

schaften der Geschwulstzellen durch die experimentelle Richtung der Krebsforschung wesentlich erweitert worden. Ferner ist es möglich, die Wachstumsbedingungen dieser Krebszellen im Wirtstiere experimentell zu studieren, namentlich die Bedingungen, die das Wachstum zu hemmen vermögen. Aber auch vom rein morphologischen Standpunkt aus sind interessante Tatsachen aus dem Studium der Tierkrebse zu erwarten, die für die menschliche Pathologie von Bedeutung sein dürften, z. B. die relative Unwesentlichkeit der histologischen Charaktere eines Tumors für die Urteile über Benignität oder Malignität.

Das histologische Studium der menschlichen Geschwülste ist meistens auf zufällige Entwicklungsstadien der Tumoren beschränkt, und der Entwicklungsgang eines Tumors kann nur durch Analogieschlüsse rekonstruiert werden. Man kann die Struktur des Tumors zur Zeit der Prüfung wohl bestimmen, wie sie aber früher war oder was aus ihr werden wird, ist nicht möglich festzustellen, wenige operativ entfernte Fälle ausgenommen. Dagegen hat das Studium künstlich fortgepflanzter Tumoren große Vorteile vor dem Studium der Tumoren beim Menschen, indem es gestattet, eine genaue Uebersicht ihres biologischen Verhaltens und histologischen Baues über ausgedehnte Zeitperioden zu gewinnen; wir haben so feststellen können, daß ein Wechsel zwischen „adenomatösen“ und solidem oder „carcinomatösem“ Bau und auch in umgekehrter Weise stattfindet<sup>1)</sup>. Bei Spontantumoren des Menschen und der Mäuse findet man diese verschiedenen histologischen Bilder nebeneinander; bei den experimentellen Tumoren treten sie sowohl nebeneinander als auch getrennt in verschiedenen Tieren auf, und es läßt sich feststellen, daß die eine Form oft in die andere übergeht, ohne daß man die Tiere dafür verantwortlich machen kann. Das sind alles „Wachstumsformen“, die durch immanente und wechselnde Eigenschaften der Tumorzellen selbst bestimmt sind. Von den von uns eingehend beschriebenen „Wachstumsformen“, die fast jeder Tumorstamm derart durchmacht, daß z. B. bei einem Mammacarcinom zu verschiedenen Zeiten ein Wechsel zwischen

1) Second Scientific Report 1905. Third Scientific Report 1908 usw.

mehr ausgeprägtem acinösem, und mehr alveolärem, histologischen Bau stattfindet, behalten die Tumoren bei immer fortgeführter Fortpflanzung die besonderen Eigenheiten ihrer Histologie und ihres biologischen Verhaltens und nähern sich in keiner Weise einem allgemeinen Typus oder verschwimmen gar ineinander.

Unsere experimentelle Erfahrung ist eine sehr ausgedehnte, da wir, abgesehen von anderen Tieren, an Mäusematerial allein über 70 verschiedene transplantierbare Tumoren eingehend studiert haben. Wir verfügen zurzeit über 43 transplantable, kontinuierlich weiterwachsende Tumoren, darunter Plattenepithelkrebs der Haut, Carcinom und Adenocarcinom der Mamma in reicher Auswahl, auch Carcinoma sarcomatodes der Mamma, ferner Spindel-, Polymorph- und Osteo-chondrosarcomata. Obwohl wir vorläufig davon absehen, allgemeine Schlußfolgerungen zu ziehen, möchten wir einige der bisherigen Resultate zusammenfassen, die nicht ohne Bedeutung sein dürften, um viele scheinbare Widersprüche zwischen unseren und den Resultaten anderer Autoren aufzuklären. Trotz individueller Variationen bei einzelnen Stämmen tauchen gewisse Eigentümlichkeiten immer wieder auf, und darum halten wir dieselben, als von fundamentaler Bedeutung und für wesentliche Charakteristika der bösartigen Geschwülste.

### **1. Experimentelle Erzeugung der Läsionen und konstitutionelle Begleiterscheinungen von Krebs.**

Wir haben die Probleme der menschlichen Pathologie fortdauernd im Auge behalten und unsere Versuchsanordnungen so gestaltet, diese möglichst genau bei Tieren künstlich nachzuahmen. Es war uns von Anfang an wohl bewußt, daß, wenn nicht gleiche Probleme zur experimentellen Lösung aufgestellt werden könnten, es unberechtigt wäre, Schlüsse auf die menschliche Pathologie zu übertragen.

Was das Uebertragen von Krebs durch Einimpfung betrifft, ist es klar, daß, wenn wir Stückchen eines Tumors oder eine größere Masse Tumorbrei unter die Haut einer Maus mittels einer hypodermischen Nadel bringen, diese

30\*

eingepfchten Zellen nicht so eingeführt sein können, daß sie das normale anatomische Verhältnis der Gewebe zu einander wiedergeben können, noch ist ein anatomisches Verhältnis ähnlich dem zwischen einer kleinen spontanen bösartigen Geschwulst und dem sie umgebenden Bindegewebe hergestellt. Selbst wenn wir alle Phasen der Krankheit, wie sie beim Menschen und anderen Säugetieren natürlich sich entwickeln, nicht experimentell hätten hervorrufen können, würde dies die große Wichtigkeit der Tatsache, daß wir Krebszellen züchten können, nicht verringern. Wäre es nur möglich gewesen, Krebszellen zu kultivieren, so wären wir immer noch in der Lage, den biologischen Unterschied zwischen den normalen und den Krebszellen zu studieren. Die einzige Bedingung von wirklicher Bedeutung ist, daß die Ausgangsmaterialien unserer Versuche wahre bösartige Geschwülste sind und nicht Tumorformationen irgendwelcher anderer Art, z. B. infektiöser Natur.

Wir sind aber in einer viel günstigeren Lage, indem die in gesunden Tieren wachsenden Geschwulstzellen imstande sind, alle die bei der natürlichen Krankheit vorkommenden Läsionen zu reproduzieren. Sie bilden nicht nur den primären Tumor an der Impfstelle, sondern sie besitzen, in den verschiedenen Geschwülsten mehr oder weniger ausgesprochen, die Fähigkeit, in die umgebenden Gewebe hineinzuwachsen und sich durch Blut- und Lymphgefäße weiterzuverbreiten, und in entfernten Organen neue Tochtergeschwülste zu bilden. Metastasen kommen, wenn geeignete Methoden angewandt werden, ebenso häufig vor und erreichen ebensowohl erhebliche Größe bei Mäusen mit eingepfctem Krebs (Fig. 1) wie bei von Spontankrebs<sup>1)</sup> befallenen Mäusen oder Menschen. Infiltrierendes Wachstum ist stark ausgeprägt in gewissen Geschwulststämmen und tritt häufig auch bei den subkutanen transplantierten Tumoren auf, die dem unbewaffneten Auge als ganz eingekapselt erscheinen. Als eklatantes

1) Murray, Spontaneous Cancer in the Mouse; Histology, Metastases, Transplantability and the Relations of malignant new Growths to spontaneously affected Animals (Third Scientific Report of the Imperial Cancer Research Fund, p. 69—115).

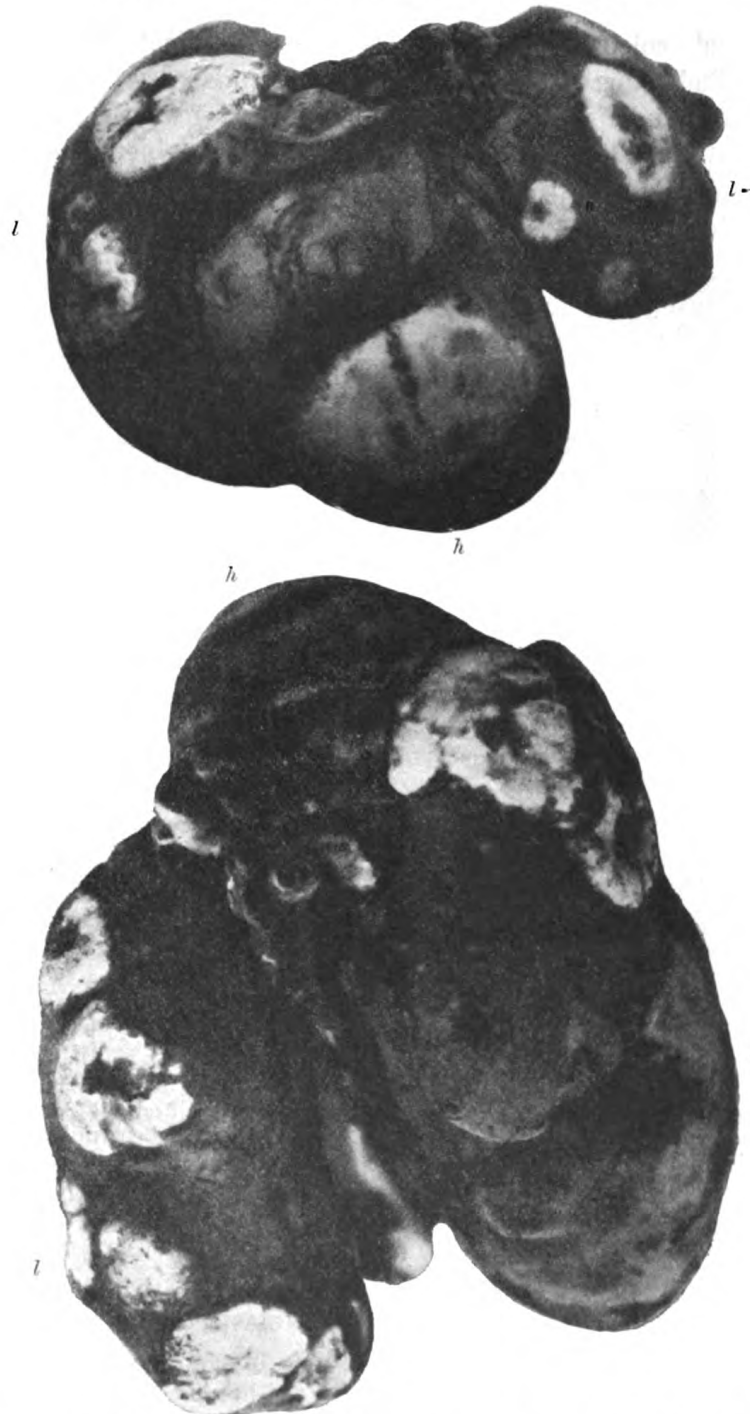


Fig. 1. Lungen und Herz einer Maus mit transplantiertem Tumor (Mischgeschwulst, 13. Generation), 6 Monate nach der Impfung gestorben. Große metastatische Knoten von dem in menschlichem Krebs typischen Aussehen mit deutlicher Krebsnabel versehen, sowohl beiderseits in den Lungen (*l*) als auch im Herzen (*h*). Oben Ansicht von vorn, unten dieselbe von hinten. Photographie, 10:1.

Beispiel solchen infiltrativen Wachstums dient Fig. 2, die das Eindringen eines gewöhnlichen subkutan transplantierten Adenocarcinoms von außen in die Darmwand illustriert. Nebenbei ist ein spontanes, von der Darmschleimhaut ausgehendes Adenocarcinom abgebildet (Fig. 3). Diese Reproduktion des Verlaufes des spontanen Krebses im Versuchstier er-



Fig. 2. Transplantiertes Mammaadenocarcinom, den Dünndarm infiltrierend. Der primäre Impftumor saß subkutan, ist durch die Bauchwand gewachsen, hat eine adhärente Dünndarmschlinge von außen infiltriert und ist destruiierend durch die Muscularis und Mucosa mit der Bildung eines carcinomatösen Ulcus gewachsen.

mutigt uns, das erschöpfende Studium aller Bedingungen, die in Verbindung mit dem Vor- oder Nichtvorkommen des infiltrierenden Wachstums und der Metastasenbildung stehen, beim überimpften Krebs anzugreifen, mit der Gewißheit, daß solches Wissen auf gleiche Läsionen beim Menschen neues Licht werfen wird. Die Möglichkeit, alle Phasen des Krebses



experimentell hervorrufen zu können, gibt uns dazu noch den großen Vorteil, konstitutionelle Bedingungen, die jenen bei spontan ergriffenen Tieren gleichen, in den geimpften Tieren studieren zu können, wie unsere Beobachtungen über Spontanheilung und die Versuche Murrays über die Beziehungen

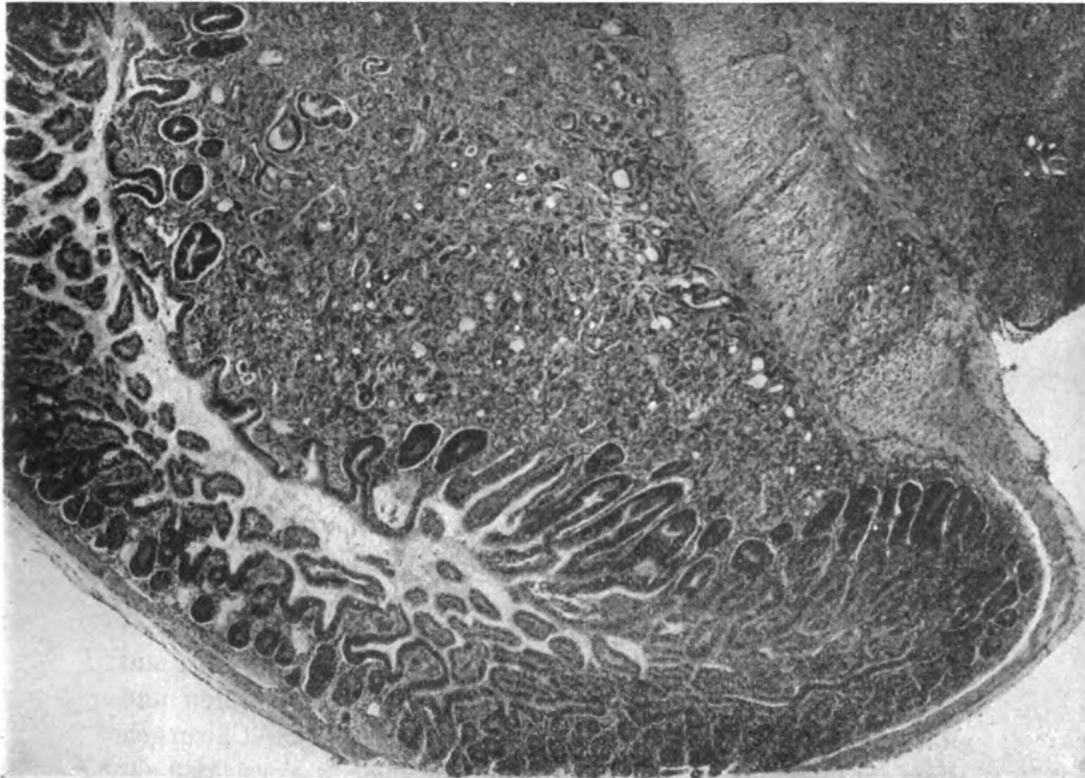


Fig. 3. Randpartie eines spontanen Adenocarcinoms des Mäuse-dünndarms, von der Mucosa ausgehend, von innen nach außen durch die Muscularis brechend. Mit Fig. 2 zu vergleichen, um die Aehnlichkeit der in transplantierten Tumoren erhaltenen Läsionen mit denjenigen der spontanen Geschwülste zu zeigen. Beide sind Mikrophotographien bei 50-facher Vergrößerung.

zwischen Tumor und spontan befallenem Tiere, Cramers, Copemans und Hakes über die Salzsäuresekretion des Magens, sowie auch Cramers über den Gaswechsel beweisen. Außerdem bietet uns die experimentelle Uebertragung den großen Vorzug, daß das gleiche Parenchym bei vielen Tieren studiert werden kann.

## 2. Vorteile der Transplantation bei Mäusen und Ratten.

Die unbegrenzte Menge der durch Ueberimpfung produzierten Zellmassen und die unbegrenzte Zeit, in welcher das Wachstum dieser Zellen durch künstliche Züchtung fortgesetzt werden konnte (sind doch die Zellen des J e n s e n s c h e n Tumors nahe an 8 Jahre am Leben erhalten), stehen in schroffem Widerspruch zur spezifischen Begrenzung des Wachstums und der Lebensdauer aller Wirbeltiere. Man hat versucht, die Bedeutung dieser Tatsachen in bezug auf das Krebsproblem im Menschen dadurch zu verringern, daß man auf die Beschränkung der Geschwulsttransplantation auf Nagetiere großes Gewicht gelegt hat.

Aber dies Phänomen der Ueberimpfung ist nicht auf Nagetiere beschränkt. Es ist uns gelungen, durch drei Generationen hindurch ein Mammacarcinom eines Hundes fortzupflanzen, und wenn unsere Versuche mit Ratten und Mäusen ebenso gering an Zahlen wären, wie unsere immer fortgesetzten Versuche mit Hunden, Katzen, Pferden und anderen Säugetieren noch heutzutage sind, erzielten wir auch keine besseren Resultate.

Mäuse sind erfolgreich mit ihren eigenen sporadischen Tumoren<sup>1)</sup> geimpft worden, und dieser Tatsache entspricht die zufällige Ueberimpfung von Krebszellen bei chirurgischen Operationen beim Menschen und Mäusen. Die Gefahr, auf diese Art Krebs in bisher gesundes Gewebe einzupfropfen und fortzupflanzen, ist beim Menschen so groß, daß viele Chirurgen sich veranlaßt gesehen haben, ganz besondere Vorsichtsmaßnahmen zu empfehlen, um dies zu vermeiden. Derselben Gefahr muß auch der Tierarzt bei Tieroperationen vorbeugen.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wird die Annahme, daß die künstliche Ueberimpfung des Krebses nur auf die Nagetiere möglich ist, als ganz unhaltbar erscheinen. Es gibt genug Gründe für die gegenteilige Annahme, daß nämlich die künstliche Fortpflanzung von Krebs wahrscheinlich bei allen Säugetieren möglich sein würde, wenn größere Versuchsreihen

1) Bashford, Murray and Cramer, The natural and induced resistance of mice to the growth of Cancer. Roy. Soc. Proc. B., Vol. 79, Dec. 10, 1906.

angelegt werden könnten und eine passende Technik gefunden wäre; wie später erwähnt werden wird, ist die Technik der Ueberimpfung auch bei Mäusen von prinzipieller Bedeutung. Die Impfung einer Anzahl junger Hunde oder Pferde, nur um dieselben Resultate zu wiederholen, die schon bei Mäusen erhalten worden sind, wäre ein außerordentlich schweres und ganz ungerechtfertigtes Unternehmen nicht nur von finanziellen Gesichtspunkten aus betrachtet, sondern auch durch die Unmöglichkeit, z. B. 1000 Pferde zu überwachen. Wenn unser Wissen und unsere Methoden so weit fortgeschritten sind, daß die Erfolgsbedingungen klargelegt sind, wird es Zeit sein, zum Studium der letzten definitiven Probleme zu größeren Tieren unsere Zuflucht zu nehmen. Daß Fortschritte in dieser Richtung möglich sind, zeigt die Tatsache, daß wir jetzt im stande sind, 80 Proz. aller spontanen Mäusetumoren erfolgreich zu verpflanzen. Deswegen braucht denen kein Gehör geschenkt zu werden, die die gegenwärtige Begrenzung der in großem Maßstabe ausgeführten Versuche auf kleine Säugetiere — Mäuse und Ratten — kritisieren, Tiere, die leicht in großen Mengen untergebracht und gepflegt werden können. Diese Einwände haben ebensoviel Wert, als wenn im Falle, daß wir Impfung z. B. bei Pferden studiert hätten, uns nun vorgeworfen würde, warum wir es nicht mit Walfischen versucht hätten.

### 3. Wichtigkeit der Impfmethode.

Bevor wir zu einer Analyse der Resultate experimenteller Fortpflanzung schreiten, kann die Bedeutung geringer Variationen in den experimentellen Methoden nicht genug hervorgehoben werden.

Das Alter, Gewicht und Rasse der Versuchstiere, die Menge des Impfmateri als, die Impfstelle und selbst die Handhabung der Technik, sind alles Faktoren, die das Endresultat erheblich verändern können. Wir haben des öfteren schon in früheren Beiträgen die Aufmerksamkeit auf diese Punkte gelenkt, und ausgiebigere Erfahrung lehrt uns immer mehr, sie zu schätzen und zu berücksichtigen. Damit andere Forscher imstande seien, unsere Beobachtungen zu wiederholen, auch um die Adoption gleicher Methoden in verschiedenen Labo-

ratorien zu fördern, möge hier eine ausführliche Beschreibung unserer Technik folgen.

Selbstverständlich war es am Anfang der Entwicklung des experimentellen Krebsstudiums unvermeidlich, daß technische Details in verschiedenen Laboratorien etwas variierten. Eine Uebersicht der Arbeitsmethoden verschiedenener Forscher auf diesem Forschungsfeld wird uns die verschiedenen Prozeduren zeigen, denen das Material während der Ueberimpfung unterworfen wurde.

Hanau führte Bruchteile seines Plattenepithelcarcinoms der Ratte in das Scrotum erwachsener Tiere durch einen Hauteinschnitt ein. Morau überimpfte auf dieselbe Weise unter die Haut, brauchte aber auch Spritzeninjektionen einer Emulsion in normaler Kochsalzlösung. Jensen benutzte auch hauptsächlich eine Emulsion seines Tumors in Kochsalzlösung, eine Methode, die auch Clowes und Gaylord anwandten, die noch dazu das Bindegewebe zu entfernen versuchten. Bei einer kleineren Reihe von Versuchen inokulierte Jensen kleine intakte Bruchstücke unter die Haut. Die Hauptmethode, die anfänglich im hiesigen Institut zur Verwendung kam, war, kleine Bruchstücke mittels einer speziell dafür angefertigten Nadel mit dazu passendem Stilet einzuführen. Borrel brachte zuerst größere Tumorstücke unter die Haut durch einen Hauteinschnitt (auch von Hertwig und Poll ausgeführt), er gebrauchte aber jetzt kleinere Bruchstücke und Hohnadel, ebenso auch dünnflüssige Emulsion in Kochsalzlösung für besondere Zwecke. Ehrlich bereitet eine Emulsion ohne Zusatz vor, welche durch Hauteinschnitt mit Pasteurs Pipetten in beträchtlichen Mengen eingeführt wird. Die genauen Dosen werden nicht angegeben.

Die Methode, die am wenigsten den Tumorzellen schadet, ist die, bei der kleine Bruchstücke des Tumors so intakt wie möglich mittels der Hohnadel eingeführt werden. Dies erklärt auch die bedeutend besseren Resultate bei von uns schon früher beschriebenen Transplantationen spontaner Tumoren. Mit dieser Methode kann man sehr genau arbeiten, wenn eine große Anzahl Tiere gebraucht wird, aber dies ist oft ein Nachteil, ebenso wie die enge Grenze, in welcher die Dosen gehalten werden müssen. Wenn man über die großen Schwierigkeiten, die Resultate verschiedener Forscher in Uebereinstimmung zu bringen, und die Unmöglichkeit, ihre Versuche genau zu wiederholen, nachdenkt, so drängt sich einem die Notwendigkeit einer Methode auf, die genaue Dosierung, ohne ernstliche Beschädigung der Zellen, gestattet.

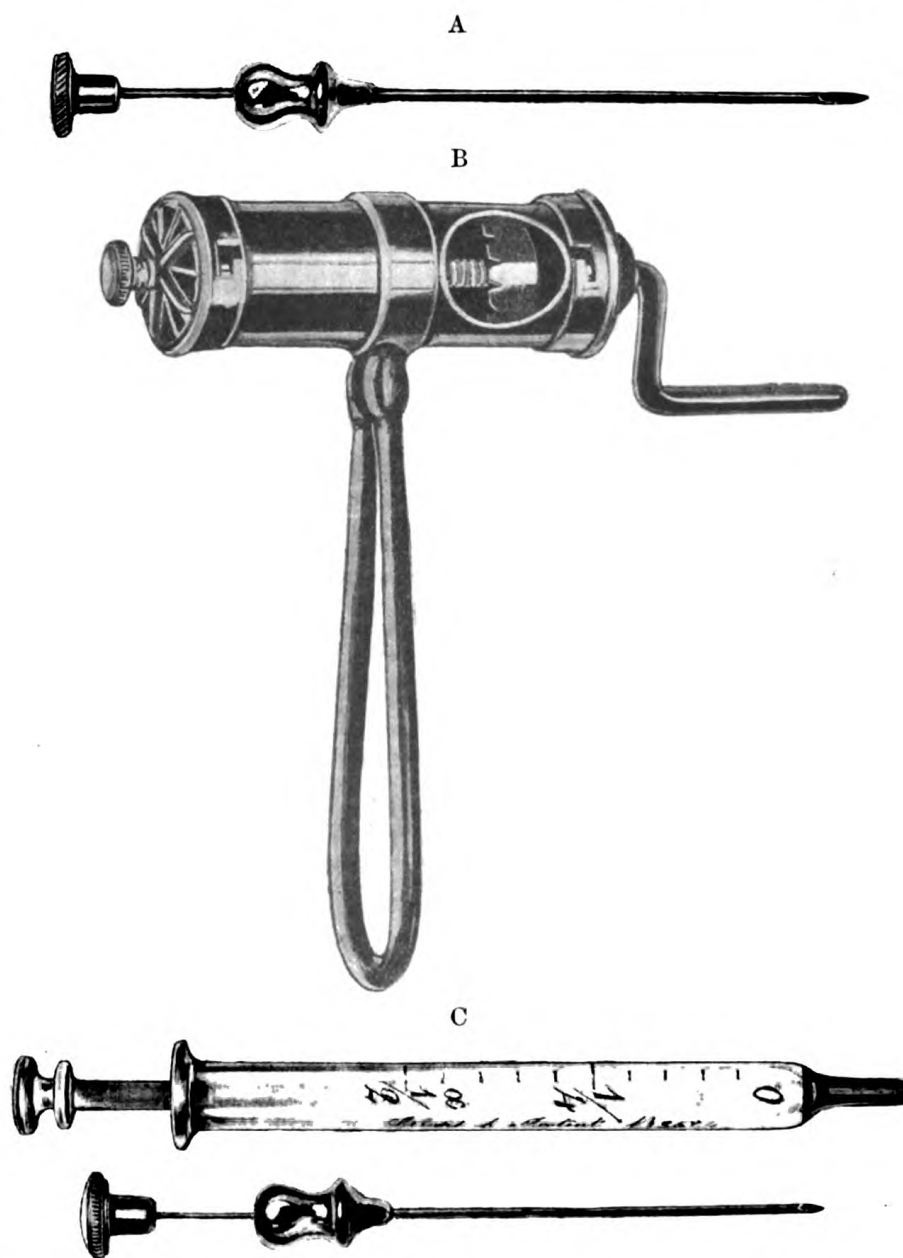


Fig. 4 A—C. A Hohnadel mit Mandrin des Imperial Cancer Research Fund für routinemäßige Transplantation. (Von Down Brothers, London bezogen.) B Kleine Fleischhackmaschine, um eine gleichmäßige Emulsion von fester Konsistenz zu bereiten. (Von Jean Mette, Kristiania, bezogen.) C Kalibrierte Glasspritze und dazu gehörende Nadel. Die Spritze von 0,5 ccm Inhalt ist für 0,05 ccm kalibriert. (Von Luer in Paris bezogen.) Sämtlich in natürlicher Größe.

Die folgende Methode wird jetzt in unserem Laboratorium angewandt und gibt befriedigende Resultate.

Nachdem der Tumor aseptisch herausgenommen worden ist, wird er zu einer gleichmäßigen Emulsion verarbeitet. Für sehr feste Tumoren wird dies leicht mit einer kleinen Fleischhackmaschine (Fig. 4 B), die Haaland<sup>1)</sup> entworfen hat, bewerkstelligt. Für weiche Tumoren ist Zerschneiden mit einer scharfen Schere zulänglich. Anstatt der Pasteur-Pipette, die eine genaue Dosierung nicht zuläßt, wenden wir eine genau kalibrierte Spritze (Fig. 4 C) an. Die Emulsion wird in einer ganz gläsernen Spritze, die 0,5 ccm hält und eine weite Oeffnung hat, aufgesogen. Die Spritze ist auf 0,05 ccm kalibriert, und die Hälfte dieser Quantität läßt sich genau ausmessen. Die Maximalmenge, die leicht zu geben ist, ist 0,5 ccm, aber in der Praxis ist es nicht ratsam, 0,2 ccm zu übersteigen. Nachdem der Tumorbrei aufgesaugt ist, wird eine hypodermische Nadel, so wie sie in einer Serumspritze gebraucht wird, oder von etwas weiterem Kaliber, der Spritzenspitze aufgesteckt, und die Injektionen werden in die Axilla oder an der Seite entlang gemacht, indem man die in der Leistengegend eingeführte Nadel bis an die Axilla vorstößt und die Emulsion während des Herausziehens langsam ausspritzt. Zwischen jeder Injektion wird die Nadel sorgfältig auf steriler Baumwolle, die mit absolutem Alkohol durchtränkt ist, abgewischt. Die Injektionsstelle wird mit Vorteil im voraus mit Alkohol befeuchtet, aber von besonderen Fällen abgesehen, ist es nicht nötig, die Haare der Injektionsstelle zu entfernen.

Mit dieser und mit der Hohlnadelmethode sind viele Zehntausende von Versuchen mit verschiedenen Tumoren ausgeführt worden; die Dosen schwankten zwischen 0,025 ccm und 0,25 ccm Emulsion mit der Spritze und zwischen 0,03 und 0,005 g mit der Nadel.

Eine Betrachtung der Resultate solcher Experimente mit Tumoren von verschiedenen Graden von Transplantationsfähigkeit zeigt, daß die Konstanten, die auf diese Weise festgestellt worden sind, von einem zum anderen Tumor variieren und daß sie von der größten Bedeutung für die Beurteilung des biologischen Verhaltens jedes Stammes sind.

1) Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 23.

Während sozusagen alle spontanen Tumoren<sup>1)</sup> der Mamma bei der Maus zum Weiterwachsen gebracht werden können, wenn nur eine große Anzahl junger Tiere mit kleinen intakten Bruchteilen inokuliert wird, ist die Zahl, die bei der Impfung von 0,05—0,1 ccm Tumoremulsion ein günstiges Resultat ergibt, viel begrenzter. Darum haben auch die Forscher, die sich für das Ueberimpfen spontaner Tumoren ausschließlich auf die letztere Methode verlassen haben, unabsichtlich eine viel einseitigere Auswahl von Material vorgenommen, als es mit den kleineren Dosen die Verimpfung der Mehrzahl aller spontanen Geschwülste gestatten, der Fall ist.

#### **4. Zunehmende Anpassungsfähigkeit und biologische Veränderungen der Tumorzellen während fortgesetzter Ueberimpfung.**

Mit dem ersten Transplantieren einer bösartigen Geschwulst von dem spontan befallenen Tier auf die erste Serie normaler Tiere (primäre Ueberimpfung, erste Generation) sind in den meisten Fällen große technische Schwierigkeiten verbunden. Um von denselben ein Bild zu geben, sei nur erwähnt, daß von 5791 Impfungen, an normalen Mäusen durch die Nadelimpfmethode mit 84 Spontantumoren vorgenommen, nur 518 Tumoren erhalten wurden, d. h. ein Erfolg von 11 Proz. In individuellen Versuchen schwankte der Erfolg zwischen 0 bis 30 Proz. der gebrauchten Mäuse, und auch die Tumoren, die in den Serien mit dem höchsten Prozentsatz entstanden, wuchsen sehr langsam und waren erst 14 Tage nach der Impfung als kleinste Knötchen fühlbar. Ueber 200 Impfungen eines Plattenepithelcarcinoms waren nötig, um die einzelne Tochtergeschwulst zu erhalten, von der die Fortpflanzung weiter ausgeführt wurde. Kurz, die Schwierigkeit, durch eine erste Ueberimpfung Krebs in Mäuse einzupflanzen, ist gewöhnlich eine erhebliche.

In einem unserer ersten Aufsätze<sup>2)</sup> haben wir die Schlüsse gezogen, daß die Tatsachen der künstlichen Ueberimpfung beweisen, daß die Genese eines Tumors scharf zu unterscheiden ist von den Bedingungen seines Weiterwachsens, und weiter,

1) Bashford, *Revue Scientifique*, June 1906, No. 22, 23; *Brit. med. Journ.*, Dec. 1 1906.

2) Bashford and Murray, *Proc. Roy. Soc. London*, Vol. 73, 1904; *First Scientific Report*, 1904. u. s. w.

daß das Resultat der Ueberimpfung wesentlich durch zwei Faktoren bestimmt ist: 1) die Qualität der eingepfunden Tumorzellen und 2) die Resistenz der geimpften Mäuse. Diese Schlußfolgerung ist auch aufs schärfste später von Ehrlich betont worden und darf wohl als allgemein anerkannt gelten. Wir haben auch betont, daß die verschiedenen näher verwandten Tumoren eines einzigen Organs resp. der Mamma untereinander große Variationen bei der Ueberimpfung zeigen, und daß diese Verschiedenheiten, die bei der Uebertragung auf gleichartige Normalmäuse hervortreten, qualitativen, primären Verschiedenheiten der Parenchymzellen zuzuschreiben sind.

Außer diesen Umständen, die am meisten die Resultate der primären Ueberimpfungen beeinflussen, sind unserer Erfahrung nach das Alter des Tieres (junge, 6 Wochen alte Mäuse sind am vorteilhaftesten), die Dosis und die Impfmethode die nächstwichtigsten. Sehr bemerkenswert ist, wie schon erwähnt, daß die Dosis bei der primären Ueberimpfung spontaner Tumoren eine größere Rolle zu spielen scheint als bei Tumoren späterer Generationen. Diese Charakteristika der primären Impfung werden hauptsächlich dadurch hervorgerufen, daß die Tumorzellen sich schwer den veränderten Lebensbedingungen, die bei dem Ueberimpfungsakt von dem Tier, in welchem Zellen zuerst bösartige Eigenschaften annahmen, auf normale Tiere unumgänglich sind, anpassen. Die auffallendste Folge ist, daß die Zahl der überlebenden Zellen bei der ersten Transplantation eine sehr geringe ist.

Im Verlauf der fortgesetzten Transplantationen wird in vielen Stämmen ein auffallend besseres Angehen und rascheres Wachstum der Tumoren beobachtet. Ehrlich hat diese Erscheinung als Virulenzsteigerung bezeichnet und sie auf eine biologische Aenderung der Zellen zurückgeführt. Für die Mehrzahl unserer Tumoren kann dieses Phänomen durch eine vollkommenere Anpassung der Zellen an die in normalen Tieren vorhandenen Wachstumsbedingungen und die dadurch bedingte Erhöhung der wirksamen Dosis erklärt werden, wobei auch die Wirkung simultaner Immunisierung eine Rolle spielt, ohne daß das Postulat einer biologischen Aenderung der Zellen nötig wird.

Wie weit vermehrte Anpassungsfähigkeit das Aussehen der Versuche verändert, kann auf verschiedene Art illustriert



werden. Diese Anpassungsfähigkeit wurde zuerst demonstriert, als Bashford und Murray 1903—1904 die Schwierigkeiten der Ueberimpfung von Jensens Tumor auf fremde

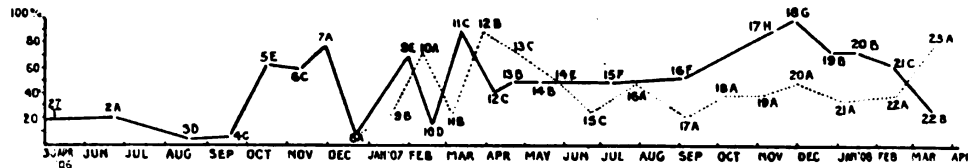


Fig. 5. Prozentkurve der Impfausbeute von einem Adenocarcinom der Mamma (Tumor 27). Nach einem kurzen Zeitraum von niedriger Impfausbeute steigt die Kurve schnell bis zur 7. Generation und fällt dann wieder. Im weiteren Verlauf unregelmäßige Schwankungen. Die Nummern geben die Impfgeneration (Zahl der Tierpassagen oder Transplantationen) an; die einzelnen Impfserien jeder Generation werden zeitlich der Reihe nach durch Buchstaben unterschieden, z. B. die Folge 3 D—4 C bedeutet, daß die 3. (oder C-) Impfserie der 4. Generation (4 C) aus einem Tumor der 4. Serie der 3. Generation (3 D) entstanden ist. Für ausführliche Erklärung der Prozentkurven siehe Zeitschr. f. Krebsforschung, Bd. 5, 1907, Heft 3.

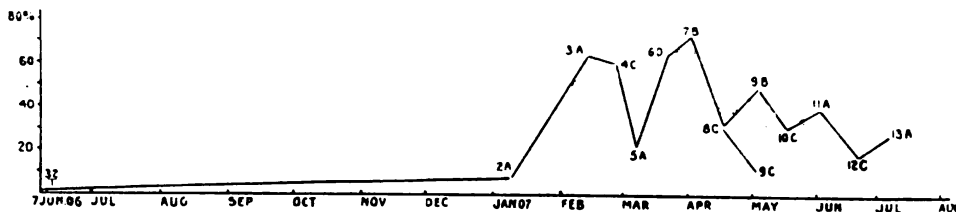


Fig. 6. Prozentkurve der Impfausbeute von Plattenepithelkrebs (Tumor 32). Schnelles Steigen bei der dritten Uebertragung, von einem Fallen und zweitem Steigen gefolgt.

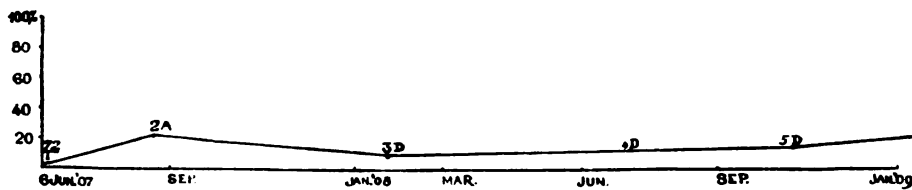


Fig. 7. Prozentkurve der Impfausbeute von einem langsam wachsenden Adenocarcinoma papilliferum der Mamma (Tumor 72).

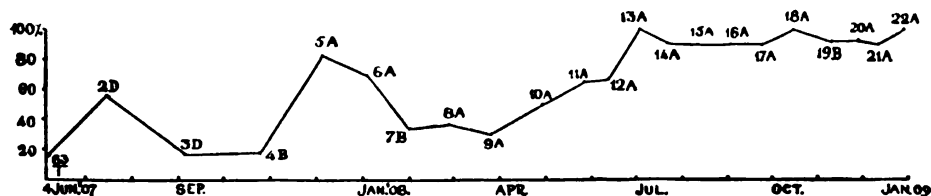
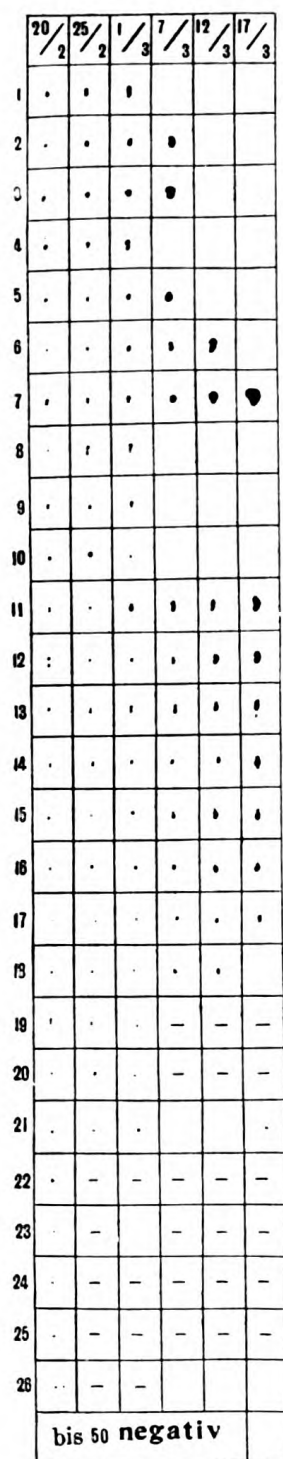


Fig. 8. Prozentkurve der Impfausbeute von einem hämorrhagischen Mammacarcinom (Tumor 63).



10 cm.

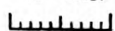
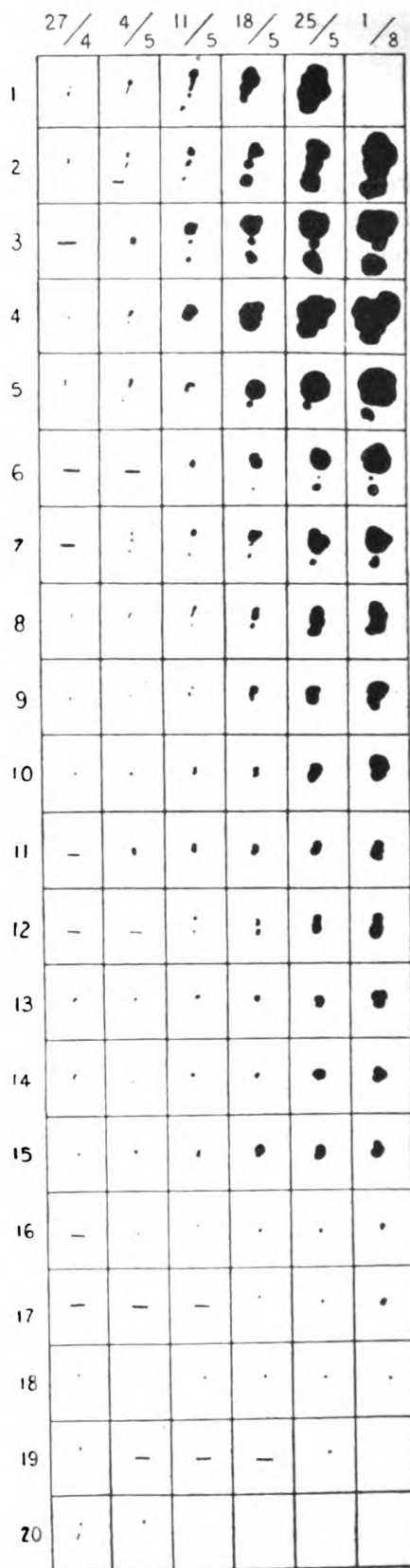


Fig. 9.

Erklärung zu Fig. 9 u. 10  
siehe p. 465.



10 cm.

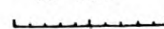


Fig. 10.

Mäuserassen überwandten und die Impfausbeute von 5 auf 90 Proz. steigen sahen!). Eine graphische Darstellung der Impfresultate in Prozenten, wie dies in Fig. 5, 6, 7, 8 für vier Tumoren gegeben ist, zeigt dieses Phänomen ganz klar. Die Kurve steigt mit jeder Ueberimpfung manchmal rapid, manchmal langsamer, drei, vier oder mehr Generationen lang. In vereinzelten Fällen scheint jedoch die Ausbeute auf einem niedrigeren Niveau zu bleiben (Fig. 7). Dieselbe anfängliche Steigerung zeigen die Kurven, die die Sarkomentwicklung bei einem unserer Tumoren illustrieren, bei jedem experimentell hervorgerufenen Sarcomstamm.

Wenn die Wachstumsschnelligkeit der individuellen Tumoren graphisch dargestellt wird, treten die feineren Züge des Prozesses deutlicher hervor, ohne die Komplikation durch eine vorübergehende Phase herabgesetzter Wachstumsenergie sofort nach der primären Ueberimpfung, wie sie bei Stamm 27 in Fig. 5 gezeigt ist. Fig. 9 zeigt die Wachstumsschnelligkeit der aus der ersten Transplantation eines hämorrhagischen Tumors (Tumor 50) entstandenen Tumoren; Fig. 10 zeigt eine spätere Serie desselben Tumors in der 9. Generation (50/9 H.). Die ursprüngliche Dosis Tumormaterials war ungefähr die gleiche bei beiden Serien (0,02 g, 0,025 ccm), und die graphischen Darstellungen zeigen die wichtige Tatsache, daß die Menge in gleichem Zeitraum produzierten Tumorgewebes bei der späteren Transplantation viel größer ist als bei der primären Ueberimpfung. Fig. 11, 12 und 13 zeigen dieselben Verschiedenheiten für die 2., 3. und 4. Generation eines Plattenepithelkrebses (Tumor 32). Die Primärtransplantation dieses Tumors ergab bei 156 Mäusen vier winzige Gewächse. Der einzige, fortdauernd wachsende Tumor erreichte in 4 Monaten die Größe einer Erbse. Die Tumoren der 2. Generation (2 A, Fig. 11) wuchsen viel

Fig. 9. Versuchsprotokoll von der ersten Uebertragung von einem hämorrhagischen Mammakrebs (Tumor 50). 81 Mäuse am 7. Febr. 1907 mit 0,02 g von Spontantumor 50 0 geimpft. Erste Chartierung 13 Tage später. Cf. Fig. 10.

Fig. 10. Versuchsprotokoll einer Serie von demselben hämorrhagischen Tumor (50) in der 9. Generation (Exp. 50/9 H.). 20 Mäuse am 17. April 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von einem 36 Tage alten Tumor aus der 8. Generation geimpft. Die erste Chartierung 10 Tage später. Cf. Fig. 9.

1) Roy. Soc. Proc., Vol. 73, 1904; First Scientific Report, 1904, p. 14.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. 1.

31

rascher, aber doch viel langsamer als die der 3. und 4. Generation (in Fig. 12 und 13 illustriert). Fig. 14, 15, 16 und 17 zeigen die Schwierigkeit, mit welcher Fortpflanzung vom Primärtumor 72 (siehe Fig. 7) erreicht wurde. Von 120 Mäusen ergab die Primär-impfung nur einen fortdauernd wachsenden Tumor. Bei der 2. Generation erhielten wir 33 Proz. von ziemlich schnell

	$2/2$	$7/2$	$12/2$	$17/2$	$22/2$	$27/2$	$4/3$	$9/3$	$30/4$
1	.	:	TR <sub>13</sub> OP <sub>2</sub> A	.	v	tr			
2	.	,	.	.	tr				
3	:	:	!	!	+				
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	-
7									
8 bis 60 negativ									

10 cm.



Fig. 11. Protokoll der zweiten Uebertragung eines Plattenepithelkrebses (Exp. 32/2 A). 60 Mäuse am 8. Jan. 1907 mit 0,02 g von dem einzigen Tumor in der 1. Generation (7 Monate alt) geimpft. Sehr langsames Wachstum der erhaltenen Tochtertumoren.

1) tr = transplantiert. 2) op = operiert.

wachsenden Tumoren. Die 3. und ebenso die 4. Generation waren beide von sehr schlechtem Erfolg. Eine Verbesserung des Prozentsatzes und der Wachstumsschnelligkeit ist in diesem Tumor bis jetzt nicht erhalten. Es würde nur zu Wiederholungen führen, die graphischen Darstellungen der 43 transplantablen Tumoren, die zur Zeit fortdauernd in unseren Laboratorien wachsen, zu geben. Wir erwähnen nur, daß

23/2 28/2 5/3 10/3 15/3 20/3 25/3 30/3 30/4

467

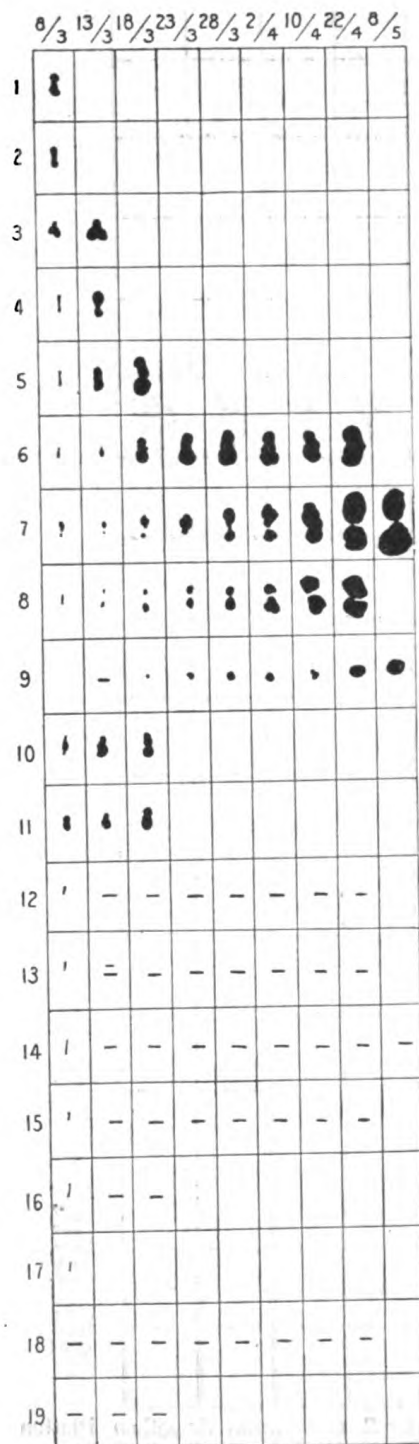
1	'	tr							
2	'	tr							
3	'	tr							
4	?	tr							
5	'	8	tr						
6	:	:	!	!	!	!	!	!	!
7	!	!	!	!					
8	.	.	.	.					
9	:	:	!						
10	!	!	!	!					
11	:	8							
12	'	.							
13	'		-	-					
14	.	-	-	-					
15	.	-	-	-					
16	.	-	-	-					
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-		

10 cm.



Fig. 12. Protokoll einer Serie der 3. Generation desselben Plattenepithelkrebses (Exp. 32/3 A). 18 Mäuse am 12. Febr. 1907 mit 0,03 g von einem 35 Tage alten Tumor der 2. Generation (Fig. 11, No. 1) geimpft.

31\*



wir darüber spezielle Untersuchungen angestellt haben, ob die am schwierigsten weiter zu verpflanzenden Tumoren begrenzte oder unbegrenzte Wachstumsfähigkeit besitzen. Der eben erwähnte Tumor 72 (Fig. 14—17) stellt einen schwer zu verimpfenden Tumor dar und Tumor 47 sogar einen noch schwerer verimpfbaren, aber trotzdem war es möglich, sie fort dauernd zu transplantieren. Wenn einmal ein Tumor erfolgreich verpflanzt ist, und er dann zu wachsen aufhört, so ist dies nicht ein Zeichen einer natürlichen Erschöpfung der Wachstumsfähigkeit, sondern es zeigt nur ungenügende Sorgfalt des Forschers, oder es geht eben über die menschliche Arbeitskraft, die Aufmerksamkeit auf alle transplantablen Tumoren zu lenken. Mit geringen Abweichungen mögen die vorgeführten Protokolle auch das Verhalten der übrigen Tumoren illustrieren.

Die Schwankungen der Impfausbeute, die eine solche

10 cm.

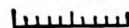


Fig. 13. Protokoll einer Versuchsserie aus der 4. Generation desselben Tumors (Exp. 32/4 C). 19 Mäuse am 26. Febr. 1907 mit 0,025 ccm von zwei 13 Tage alten Tumoren der 3. Generation (No. 3 und 4 in Fig. 12) geimpft.

konstante Erscheinung unserer Prozentsatzkurven späterer Impfungen sind, werden gewöhnlich von parallelen Schwankungen der Wachstumsschnelligkeit der überimpften Tumoren begleitet, aber die Uebereinstimmung ist nicht absolut. Während einige langsam wachsende Tumoren gewöhnlich bei Serien

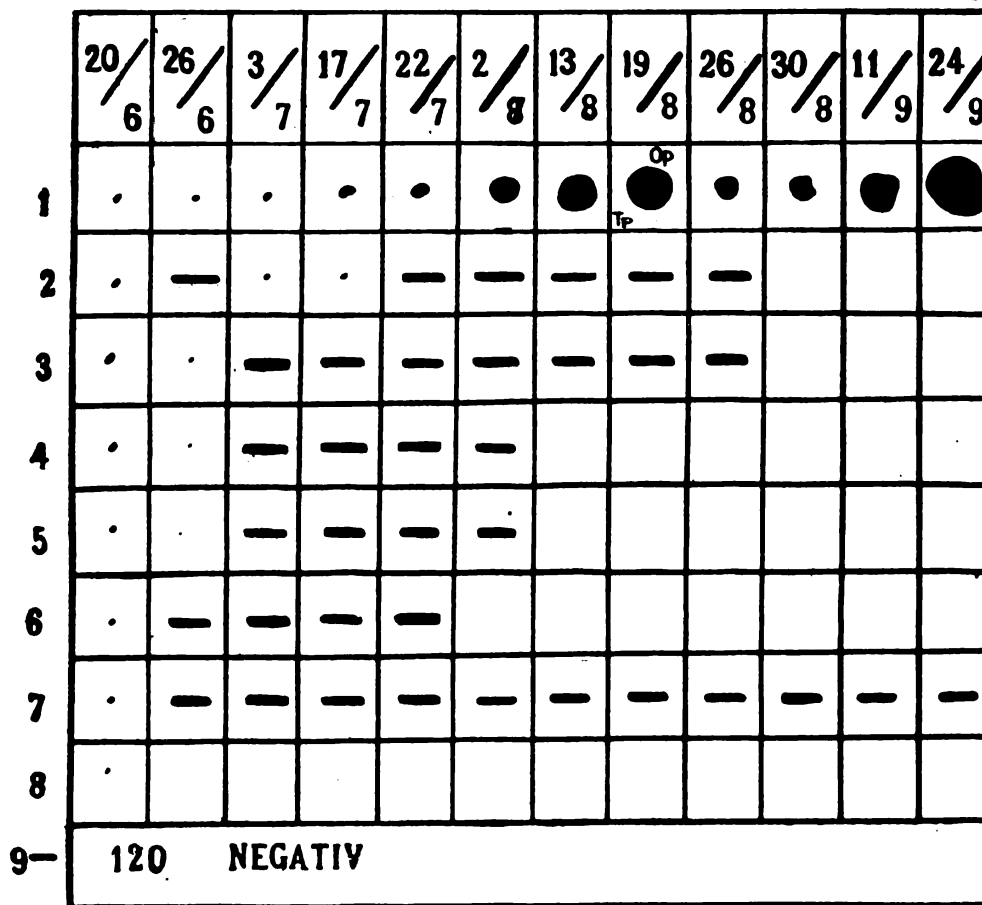


Fig. 14. Protokoll der primären Ueberimpfung von einem Adenocarcinom der Mamma (Tumor 72, Exp. 72/1). Nur ein Tumor ist erhalten worden in 120 Mäusen, die am 1. Juni 1907 mit 0,02 g von Spontantumor 72/0 geimpft wurden.

10 CM.

von hoher Impfausbeute gefunden werden, können auch rasch wachsende Tumoren, sogar häufig, in Serien von niedrigem Prozentsatz, vorkommen; aber im allgemeinen laufen die beiden Phänomene parallel. Gerechterweise können die Vergleiche nur zwischen Serien, die zu denselben Tumorenstämmen

gehören, gezogen werden; verschiedene Stämme zeigen als wichtiges biologisches Charakteristikum, allerlei Beziehungen zwischen Angangsfähigkeit und Wachstumsenergie der gegebenen Tumoren, so daß die Unabhängigkeit der beiden

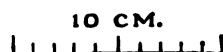
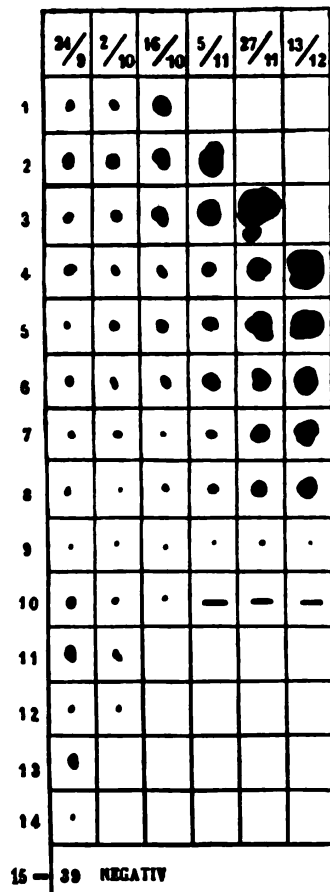
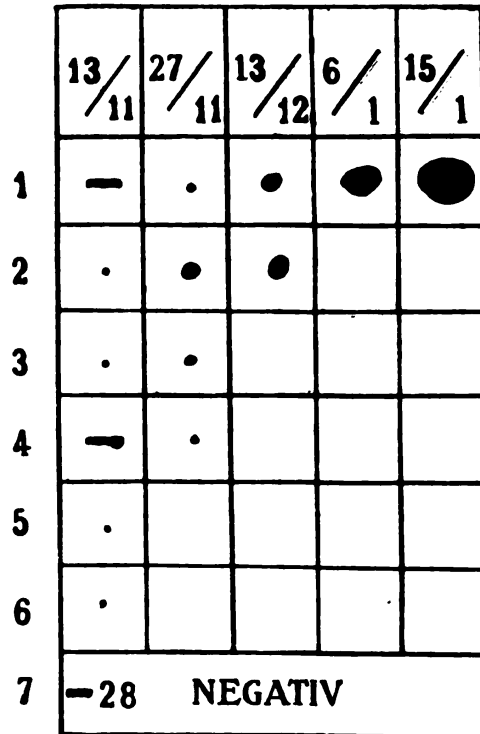


Fig. 15.

(Exp. 72/3 A). Wachstum der erhaltenen Tumoren nach Inokulation in 28 Mäuse von je 0,02 g eines 58 Tage alten Tumors der 2. Generation (No. 1 in Fig. 15).

Charaktere besonders deutlich ist, wenn wir von einem Stamm zum anderen übergehen.

Es ist möglich, daß sekundär auftretende biologische Veränderungen die erhöhte Anpassung begleiten. Da es natür-



10 CM.



Fig. 16.

Fig. 15. Protokoll der zweiten Ueberimpfung desselben Tumors (Exp. 72/2 A). Wachstum der erhaltenen Tumoren nach Inokulation in 93 Mäuse von je 0,02 g von dem Tumor No. 1 in Fig. 14, 80 Tage alt.

Fig. 16. Protokoll einer Versuchsserie der 3. Generation desselben Tumors erhaltenen Tumoren nach Inokulation in 28 Mäuse von je 0,02 g eines 58 Tage alten Tumors der 2. Generation (No. 1 in Fig. 15).



liche Variationen der Wachstumsschnelligkeit gibt, könnte eine stärkere Wachstumsenergie vielleicht das Resultat lange fortgeführter Auswahl rasch wachsender Tumoren sein. Die Umgebung mag ebenfalls bei einem jahrelang fortgepflanzten Tumor mitzusprechen haben. Eines der ersten Resultate der

	27/ 1	6/ 2	14/ 2	21/ 2	28/ 2	6/ 3	13/ 3	27/ 3	7/ 4
1	—	—	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	—	—	.						
4	.	.	.						
5	.	—	—	—	—	—	—	—	—
6	.	—	—	—	—	—	—	—	—
7	.	—	—	—	—	—	—	—	—
8	29 NEGATIV								

10 CM.



Fig. 17. Protokoll einer Versuchsserie der 4. Generation desselben Tumors (Exp. 72/4 A). Wachstum der erhaltenen Tumoren nach Inokulation in 29 Mäuse von je 0,02 g des Tumors No. 1 in Fig. 16.

experimentellen Krebsforschung bestand in den Beobachtungen von Bashford und Murray, sowie Michaelis, daß die Mäusetumoren eines Landes in den Mäusen eines anderen Landes schlecht oder gar nicht angingen, obwohl den ersten Beobachtern auch die Schnelligkeit auffiel, mit der die

Zellen der neuen Umgebung angepaßt werden konnten <sup>1)</sup>. Dies Phänomen gleicht wahrscheinlich dem bei der Primärtransplantation sporadischer Tumoren bemerkten, wenn ein gewaltsamer Umgebungswechsel zur Zeit der Ueberimpfung von dem Ausgangstier stattfindet. Haaland hat über diese Wachstumsbedingungen verschiedener Tumoren in fremden Rassen eingehendere Studien gemacht <sup>2)</sup>. Voriges Jahr wurde jedoch die Genauigkeit aller solcher Beobachtungen von Hertwig und Poll ohne genügende Begründung angezweifelt. Wir haben unsere Tumoren einer großen Anzahl ausländischer Forscher zugeschickt, und besonders Gierke hat eine Anzahl Fälle ausführlichst beobachtet, indem er unsere Tumoren in deutsche Mäuse, in London wie in Berlin mit dem Resultat verpflanzte, daß Hertwigs und Polls Einwendungen hinfällig geworden sind <sup>3)</sup>.

Theoretisch betrachtet, könnte das fortgesetzte Wachstum der Zellen in dem Boden, der durch die Mäuse einer Rasse oder eines Landes geliefert wird, sie weniger wachstumsfähig in anderem Boden — Mäusen anderer Rassen und Länder — oder selbst in dem Boden, an den sie ursprünglich gewöhnt waren, machen. Darum haben wir unsere früheren Beobachtungen an Jensens Tumor mit frischem, aus Dänemark zusammen mit dänischen Mäusen geschicktem Material wiederholt. Obgleich die Versuche durch ihre geringe Zahl nicht für definitiv anzusehen sind, zeigen dieselben doch, daß Jensens Tumor nach 3-jährigem Wachstum in englischen Mäusen nicht seine Wachstumsenergie in dänischen Mäusen verloren hatte, und daß er in ihnen im ganzen sogar etwas besser wuchs als die dänischen Kontrolltumoren; jedoch gedieh der englische Tumor besser in englischen als in dänischen Mäusen.

1) Wie schon mitgeteilt, haben wir unsere Tumoren nach auswärts geschickt, und die Ueberimpfungen haben hohe Prozentsätze entsprechend denen bei den englischen Kontrollmäusen ergeben. Es spielen wieder hier zweierlei Faktoren mit, die Empfänglichkeit der Mäuserassen und die biologischen Eigenschaften der Tumorzellen, die nicht nur bei verschiedenen Tumoren verschieden sind, sondern auch bei ein und demselben Tumor zwischen positiven und negativen Wachstumsphasen wechseln, wie später beschrieben wird (vide Roy. Soc. Proc., B, Vol. 79, 1906, p. 176; Science Progress, July 1907) usw.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 23.

3) Verhandlungen d. Deutschen Pathol. Gesellsch. Kiel 1908.

Gewisse in einzelnen Tumorstämmen beobachtete Tatsachen sind ohne die Annahme einer biologischen Aenderung der Zellen während fortgesetzter Transplantation nicht zu erklären. Ein Beispiel dieser Art ist der Verlust des ursprünglichen hämorrhagischen Charakters einiger Mammacarcinome im Verlauf fortgesetzter Fortpflanzung, gleichzeitig mit Steigerung der Impfausbeute und Wachstumsgeschwindigkeit (cf. Fig. 8). Besonders die bei der Entwicklung eines Sarkoms beobachteten Vorgänge, die von einem von uns in Detail beschrieben sind<sup>1)</sup>, scheinen diesen Schluß zu rechtfertigen, ebenfalls die neulich im hiesigen Institut von Russell beobachtete Entstehung eines Sarkoms aus dem Bindegewebe eines hämorrhagischen Carcinoms. Ob diese biologische Aenderung nur als die Folge des Herauszüchtens von besonders wachstumsfähigen Zellvariationen anzusehen sei, oder ob die Transplantation allmählich progressive Veränderungen herbeiführen kann, möchten wir zurzeit dahingestellt sein lassen. Aus den oben erwähnten Untersuchungen ist es wahrscheinlich gemacht, daß das Ueberimpfen eine große Rolle spielen kann, um progressive Veränderungen, die zur Erwerbung von sarkomatösen Eigenschaften führen, auszulösen. Was während der künstlichen Verpflanzung vor sich geht, mag nur eine künstliche Reproduktion — allerdings vielleicht unter sehr intensiven Einflüssen — dessen sein, was in dem Tiere sich abspielt, in welchem Krebs sich natürlich entwickelt.

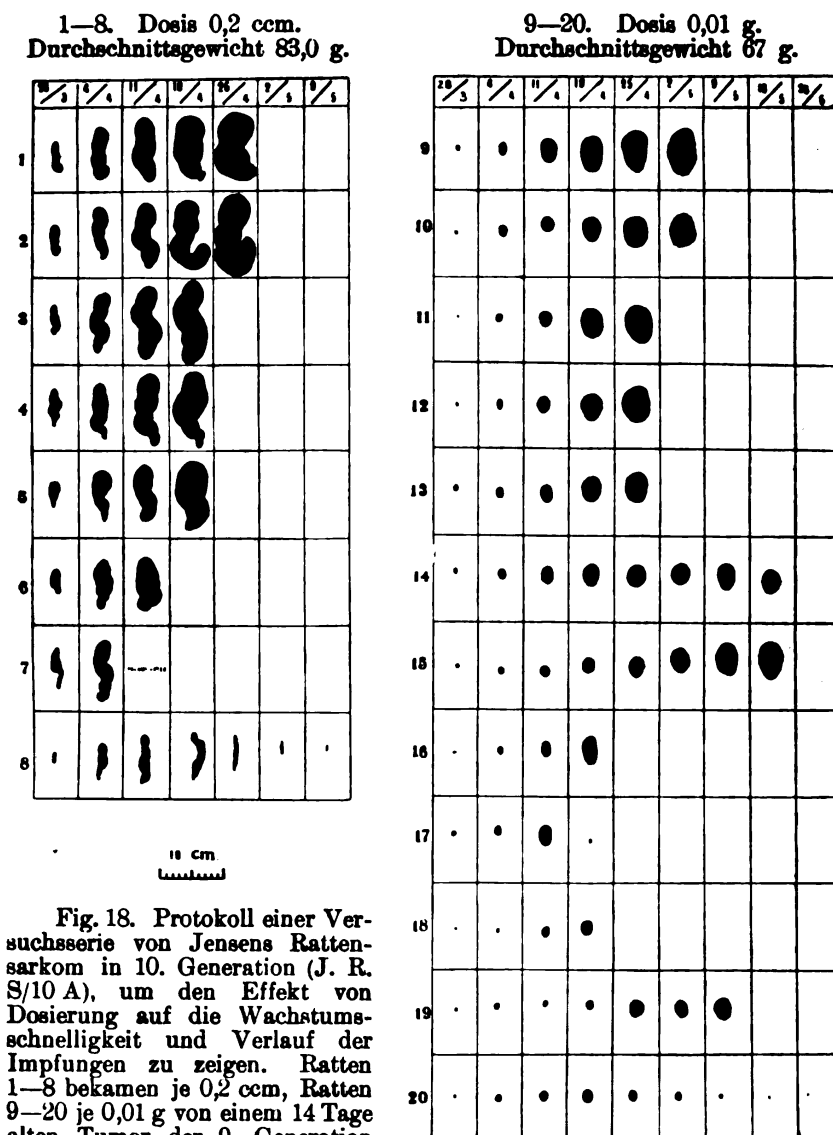
##### **5. Die Wichtigkeit der Dose beim Bestimmen der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors.**

Die Größe, die die Geschwülste irgend eines Tumorstammes in einer bestimmten Zeit erreichen, wird teilweise von der Proportion der eingeführten Zellen, die sich den neuen Verhältnissen anpassen, bestimmt, d. h. durch die Größe der wirk-samen Anfangsdosis oder Zahl der überlebenden Zellen. Daß dies der Fall ist, kann durch Versuche gezeigt werden, bei denen die Anfangsdosis des Tumormaterials variiert.

Das einfachste Phänomen tritt zutage in Versuchen mit

1) Haaland, Contributions to the Study of the Development of Sarcoma under experimental Conditions. Third scientific Report of the Imperial Cancer Research, 1908, p. 175—262.

Tumoren, die mit einer zu der Größe der eingeführten Dosis proportionalen Schnelligkeit wachsen.



Die auf der nächsten Seite gegebene Tabelle zeigt die Unterschiede zwischen den nach großen und kleinen Dosen in derselben Zeit erhaltenen Tumormengen in demselben Tiere. Nach simultaner Impfung rechts und links mit kleinen resp. großen Dosen sind die Tiere zu verschiedenen Zeiten getötet und die Menge der beiderseits erhaltenen Tumoren durch Wägung exakt gemessen.

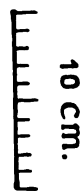
Gewicht der Ratte bei der Tötung	Tage nach der Impfung	Gewicht des Tumors in d. rechten Axilla, Dosis 0,025 ccm	Multiplum von Dosis erhalten	Gewicht des Tumors in der linken Axilla, Dosis 0,25 ccm	Multiplum von Dosis erhalten	Verhältnis der Gewichte der beiderseitigen Tumoren (das Verhältnis der Dosen = 1:10)
72 g	11	0,38 g	12,2-fach	2,2 g	8,8-fach	1:5,8
65 "	15	0,9 "	36 "	3,35 "	13,3 "	1:3,72
70 "	15	1,25 "	50 "	6,1 "	24,4 "	1:4,8

Exp. J.R.S/15 A. 3 Ratten am 30. Juni 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von Jensens Rattensarkom in die rechte Axilla und gleichzeitig mit 0,25 ccm in die linke Axilla geimpft. Die Gewichte der Tumoren sind 11 und 15 Tage nach der Impfung bestimmt worden.

Ein transplantables Spindelzellsarkom der Ratte, welches wir Prof. Jensen verdanken, zeigt dies in diagrammatischer Weise. In Fig. 18 wird ein Versuch gezeigt, bei welchem zwei Gruppen von Ratten mit verschiedenen Dosen desselben Materials geimpft wurden. Ratten 1—8 erhielten 0,2 ccm der Tumoremulsion in die rechte Axilla, während Ratten 9—20 nur  $\frac{1}{20}$  dieser Menge erhielten (0,01 g). Die Größe der aus der größeren Dosis nach 10 Tagen entstandenen Tumoren und ihr weiteres Wachstum stehen in auffälligem Kontrast zu den aus den kleinen Dosen entstandenen Tumoren. Sie sind beinahe 20mal so groß, und die Tiere erliegen viel schneller. Wichtig ist, zu bemerken, daß die Impfausbeute in beiden Serien dieselbe ist (100 Proz.). Die obige Tabelle veranschaulicht die Gewichtszunahme von aus großen und kleinen Dosen entstandenen Tumoren nach 11 resp. 15 Tagen, als die Tiere getötet wurden.

Wenn Versuche mit anderen Tumoren, besonders mit transplantablen Mäusecarcinomata, mit denselben Dosen angestellt werden, wird jedoch dasselbe Resultat selten erzielt. Fig. 19 (Exp. 32/23 E) gibt einen ähnlichen Versuch mit einem transplantablen Plattenepithelcarcinom (Tumor 32) wieder. Die eine Hälfte der Mäuse (1—14) dieses Versuches wurden mit 0,025 ccm einer Tumoremulsion geimpft, die andere Hälfte (15—28) mit 0,15 ccm desselben Materials. Bei allen trat zuerst Wachstum ein, aber obgleich die Dosen sich wie 1:6 verhielten, sind die aus den größeren Dosen entstandenen Tumoren nicht entsprechend größer als die aus den kleineren Dosen hervorgegangenen. Wie in dem eben beschriebenen

Fig. 19. Protokoll einer Versuchsserie mit Plattenepithelkrebs, um einen analogen Effekt von Unterschieden in der Dosierung zu zeigen, mit der Fig. 18 zu vergleichen. Sämtliche Mäuse am 6. März 1908 mit Plattenepithelkrebs in der rechten Axilla geimpft. Mäuse 1—14 Dosis 0,025 ccm; Mäuse 15—28 Dosis 0,15 ccm. Höhere Impfscheube und schneller wachsende Tumoren nach den größeren Dosen als nach den kleineren (Exp. 32/23 E).



10 cm.

	16/3	19/3	26/3	29/3
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				

	16/3	19/3	26/3	29/3
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				

Rattenversuch wuchsen die aus großen Dosen entstandenen Tumoren schneller und wenige davon werden spontan resorbiert. Der Unterschied zwischen den zwei Hälften des Versuches 32/23 E (Fig. 19) wird durch die Verschiedenheit der Anfangsdosis der zwei Reihen verursacht. Die Verschiedenheiten der Wachstumsschnelligkeit zwischen den Tumoren der ersten Hälfte des Versuches 32/23 E (Fig. 19) und des Versuches 32/4 C (Fig. 13), ehe dieser Stamm gut zu wachsen anfang, kann durch den Einfluß desselben Faktors ausreichend erklärt werden. Obgleich die eingeführte Gewebsmenge bei beiden die gleiche war, ist die wirksame primäre Dosis, d. h. die Zahl der überlebenden Zellen größer bei einem als wie beim anderen, und es liegt kein Grund vor, eine andere Auslegung des Kontrastes zwischen Versuch 32/4 C (Fig. 13) und Versuch 32/2 A (Fig. 11) anzunehmen. Bei den Versuchen JRS/10 A (Fig. 18) und 32/23 E (Fig. 19) werden diese Verschiedenheiten mit Absicht hervorgebracht. Die Verringerung der wirksamen Dosis bei Versuch 32/2 A (Fig. 11) im Vergleich zu Versuch 32/4 C (Fig. 13) ist unbeabsichtigt, sie ist das Resultat der natürlichen Auslese der wachstumsfähigen Zellen, und der noch unvollkommenen Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen den neuen Wirten gegenüber.

Ähnliche, mit verschiedenen Tumoren ausgeführte Versuche zeigen uns, daß der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Impfungen mit großen und kleinen Dosen oft gerade umgekehrt ist. Fig. 20, Versuch 32/8 L, illustriert den Kontrast der Impfergebnisse bei zwei Reihen gleichartiger Mäuse, zwischen denen der einzige Unterschied darin besteht, daß, während die Mäuse der einen Gruppe je 0,1 ccm der Emulsion des Plattenepithelcarcinoms erhielten, diejenigen der anderen 0,05 ccm desselben Materials bekamen. Das Protokoll zeigt, daß in beiden Reihen 8 Tage nach der Impfung beträchtliches Wachstum stattgefunden hatte. Der weitere Verlauf der Tumoren der zwei Gruppen — alle 5 Tage nachgesehen — zeigt einen bemerkenswerten Widerspruch. Die Tumoren, die in den mit den kleineren Dosen geimpften Tieren sich entwickelten, wuchsen mit Ausnahme der kleinen Knötchen der Mäuse 17 und 18 rasch und fortdauernd. Dagegen war das Wachstum bei den Mäusen, die 0,1 ccm von Tumoremulsion erhielten, vorübergehend. 14 Tage später konnte bei den Ueberlebenden

	$\frac{8}{5}$	$\frac{13}{5}$	$\frac{17}{5}$	$\frac{22}{5}$	$\frac{27}{5}$	$\frac{31}{5}$	$\frac{5}{6}$
1	8	8	!	o	-	-	-
2	o	!	:	-	-	-	-
3	o	gestorben					
4	8	!	o	-	-	-	-
5	8	8	!	-	-	-	-
6	8	8	-	-	:	:	!
7	8	8	:	-	-	-	-
8	8	:	o	-	-	-	-

Fig. 20. Protokoll einer Versuchsserie mit Plattenepithelkrebs, um den Kontrast in dem Impferfolg nach großen und kleinen Dosen desselben Tumormaterials in normalen Mäusen zu zeigen. Sämtliche Mäuse sind am 30. April 1907 mit Plattenepithelkrebs in die rechte Axilla geimpft worden, die erste Reihe (Mäuse 1—8) Dosis 0,10 ccm, die zweite Reihe (Mäuse 9—18) Dosis 0,05 ccm. — Mit der Fig. 19 zu vergleichen, die einen ähnlichen Versuch mit demselben Tumor mit ganz verschiedenem Erfolg illustriert. (Exp. 32,8 L.)

10 CM.





	8 / 6	13 / 5	17 / 5	22 / 5	27 / 5	31 / 5	5 / 6
9	!	!	!	!	!	!	!
10	!	!	!	transplantiert			
11	!	!	transplantiert				
12	!	!	!	!	!	transplantiert	
13	!	!	transplantiert				
14	!	!	gestorben				
15	!	!	gestorben				
16	o	gestorben					
17	;	-	-	-	-	-	-
18	.	-	-	-	-	-	-

nicht die geringste Spur von Tumor gefühlt werden. Bei einer (No. 6) erschien nach weiterer Pause von 10 Tagen ein kleines Knötchen, welches progressiv wuchs; die anderen Mäuse blieben negativ. Dies ist das häufigste Ergebnis, wenn Mäuse mit großen und kleinen Dosen dieses Tumors geimpft werden. Kleine Dosen wachsen fortwährend und gut, während große Dosen, selbst wenn sie zuerst von einem erheblichen Wachstum gefolgt sind, entweder Tumoren ergeben, die zum Stillstand kommen oder spontan verschwinden. Man kann die natürliche Widerstandsfähigkeit der Mäuse nicht für diese Anomalie verantwortlich machen. Die direkt auf die Impfung folgenden Tage, während welcher die Revaskularisation des eingepfchten Bruchteils stattfindet, bilden die Periode im Verlauf eines transplantierten Carcinoms, zu der die Zellen für schädigende Einflüsse am empfindlichsten sind, und während dieser Zeit ist kein merkbarer Unterschied des Wachstums in beiden Reihen der Fig. 20 zu beobachten.

Fig. 21 und 22, (ähnliche Versuche mit J e n s e n s Carcinom) zeigen denselben Kontrast zwischen den Ergebnissen zu verschiedener Zeit ausgeführter Impfungen mit großen und kleinen Dosen. Bei dem Versuch Fig. 21 wurden drei Gruppen gleichaltriger Mäuse mit verschiedenen Dosen desselben Materials geimpft. Mäuse No. 1—10 erhielten 0,025 ccm, 11—19 0,05 ccm und 20—31 0,1 ccm. Die in 10 Tagen erhaltenen Tumoren sind größer und wachsen schneller in den mit größeren Dosen geimpften Reihen (cf. Fig. 18 und 19). Versuch J/102 C (Fig. 22) ergibt ein anderes Resultat. Die Versuchsanordnung ist die gleiche, aber während Tumoren erschienen und wuchsen in den mit größten und kleinsten Dosen gemachten Reihen, wurde nur ein kleiner, langsam wachsender Tumor bei der Gruppe, die mit der mittleren Dosis (0,05 ccm, 11—20) geimpft war, erhalten. Diese Phänomene werden später noch besprochen werden. Sie deuten auf quantitative Beziehungen zwischen der Tumordosis und der Reaktion der Tiere hin und sind durch die Annahme einer simultanen Immunisierung am besten verständlich, die durch die mittleren Dosen deutlich zum Vorschein kommt, während sie bei den kleinen Dosen nicht genügend war und bei den größeren Tumorgaben wieder überwunden wird, wie Bashford,

Murray und Cramer schon früher<sup>1)</sup> und später auch Borrel und Bridré<sup>2)</sup> hervorgehoben haben.

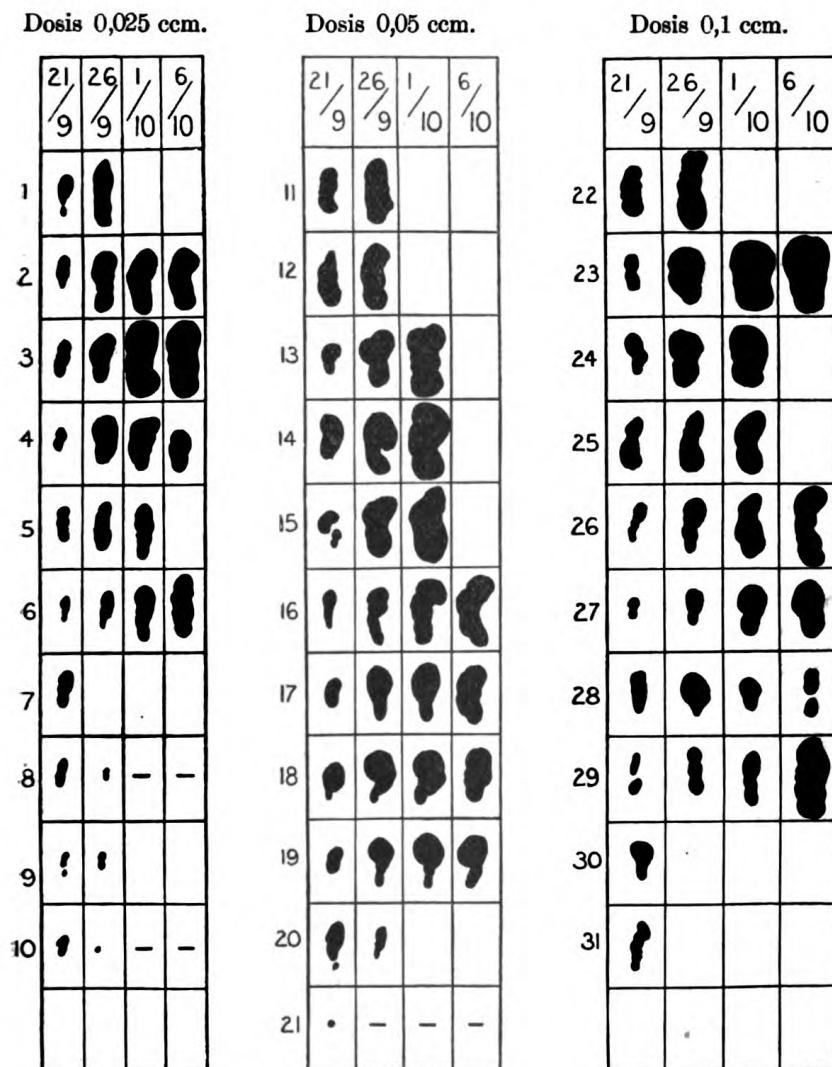


Fig. 21. Protokoll einer Versuchsserie des Jensenschen Tumors in der 99. Generation. Sämtliche Mäuse am 11. Sept. 1907 in die rechte Axilla geimpft. 1—10 Dosis 0,025 ccm, 11—21 Dosis 0,05 ccm, 22—31 Dosis 0,10 ccm Emulsion von Jensens Carcinom (Exp. J/99 C).

1) The natural and induced Resistance of Mice to the Growth of Cancer. Rep. Soc. Proc., B., Vol. 79, p. 183, Dec. 10, 1906.

2) Recherches sur le cancer expérimental des Souris. Annal de l'Institut Pasteur, No. 10, Oct. 21, 1907.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. I.

32

Der Unterschied in dem Verhalten von dem Plattenepithelkrebs (Tumor No. 32) und Jensens Tumor zu ver-

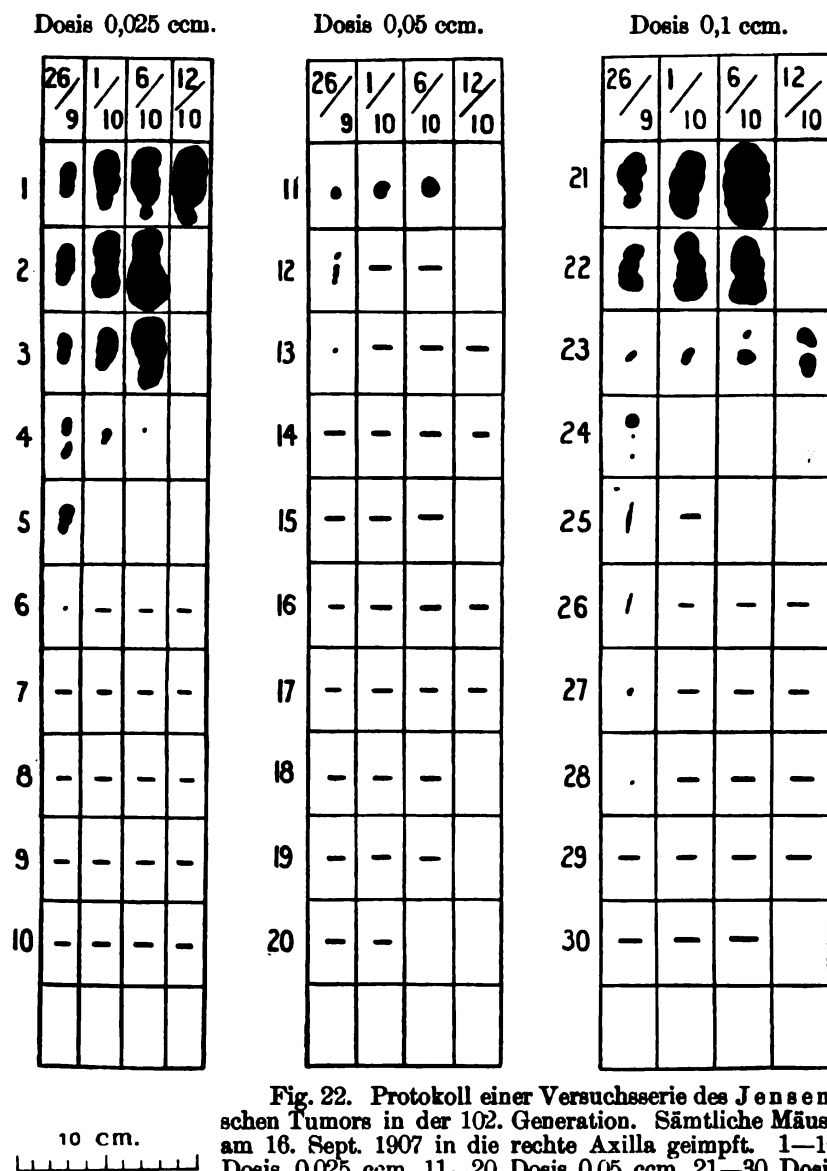


Fig. 22. Protokoll einer Versuchsserie des Jensenschen Tumors in der 102. Generation. Sämtliche Mäuse am 16. Sept. 1907 in die rechte Axilla geimpft. 1–10 Dosis 0,025 ccm, 11–20 Dosis 0,05 ccm, 21–30 Dosis 0,10 ccm Emulsion von Jensens Carcinom (Exp. J/102 C).

schiedenen Zeiten in betreff der Wirkung der Verschiedenheiten in der Dosis eingepfunden Materials kann nur bedeuten, daß

die Zellen eines und desselben Tumorstammes zu verschiedenen Zeiten biologisch verschieden sind. Dies Phänomen wird ebenso bei den meisten anderen transplantablen Tumoren beobachtet. Einmal geben große Dosen einen höheren Prozentsatz von rascher wachsenden Tumoren als kleine, ein anderes Mal ist das vorübergehende Wachstum aus großen Dosen von spontaner Resorption gefolgt. Wichtig zu beachten ist, daß unsere Sarkome, welche während der Verpflanzung von Tumor 37 sich entwickelten, die Erscheinung auch zeigten, so wie auch unser transplantables Osteochondrosarkom zum Unterschied von Jensens Rattensarkom, welches unserer Erfahrung nach dies nicht tut, sondern ohne in dieser Weise zutage tretende Schwankungen weiterwächst.

#### **6. Wirkung von simultaner Immunisierung der Wirtstiere und wechselnden Eigenschaften der Tumorzellen.**

Die Wirkung der Resorption des Tumorgewebes gleichzeitig mit dem anfänglichen Wachstum nach Einimpfung tritt nicht weniger klar, jedoch in geringerem Maßstab und auf andere Art, beinahe in jedem Versuchsprotokoll hervor. Wir werden diese besondere Wirkung hier näher besprechen, wegen ihrer Wichtigkeit für die Deutung der graphischen Darstellungen der Wachstumsgeschwindigkeit und Angangsfähigkeit, um dieselben für eine experimentelle Analyse des Carcinomwachstums zu verwenden. Bei den meisten Impfserien, von welchen Illustrationen beigelegt worden sind, gibt es eine Anzahl Tiere, bei denen vorübergehende Proliferation <sup>1)</sup> durch schnelle Absorption der Tumorknötchen abgelöst wird. Dies Phänomen fällt bei allen verpflanzbaren Tumoren auf, die wir studiert haben, und kommt auch bei primären Transplantationen spontaner Tumoren vor. Es ist wahrscheinlich unrichtig, anzunehmen, daß dies nur durch natürliche Resistenz des Impftieres zu

1) Das vorübergehende Wachstum ist nicht zu verwechseln mit der Spontanheilung von gut angegangenen Tumoren, wie wir sie anderswo beschrieben haben. (Action of Radium on transplanted Mouse Tumours and its relation to spontaneous Arrest of their Growth, Second Report of the Imperial Cancer Research, 1905.) The experimental Analysis of the Growth of Cancer. Roy. Soc. Proc., B., Vol. 78, May 1906, u. Zeitschr. f. Krebsforschung, 1907.

erklären ist. Wenn die Tiere von vornherein resistent wären, müßten wir annehmen, daß die Proliferation von Anfang an verhindert werden würde, wie wir es bei künstlich immunisierten Tieren sehen, und es wird nicht verständlich, warum kleine Dosen eine bessere Impfausbeute geben können als größere Dosen desselben Tumors. Es kommt selten vor, daß von Anfang an die Proliferation verhindert wird. Die Widerstandsfähigkeit ist nicht präexistierend, aber tritt im Anschluß an die Impfung auf. Diese Veränderung wird wahrscheinlich durch die in den Tagen nach der Impfung vor sich gehende Absorption des Tumormaterials erzeugt<sup>1)</sup>. Die Tumoren, die andauernd wachsen, zeigen häufig gleichzeitig mit dem Anfang des Verschwindens der nur vorübergehend wachsenden Tumoren derselben Versuche einen Stillstand des Wachstums oder selbst eine zeitweise Verringerung der Größe. Dies kann in übertriebener Art bei Maus 6, Versuch 32/8 L, Fig. 20, gesehen werden. Das Phänomen tritt gewöhnlich zwischen dem 10. und 24. Tag nach der Inokulation auf, ist sehr auffällig bei der zweiten Chartierung am 17. Tag, und wenn die Tumoren andauernd wachsen, ist es schon am 24. Tag — wenn die Tumoren zum dritten Mal chartiert werden — verschwunden. Wie ist es zu erklären, daß bei einigen Tieren der Einfluß der Gewebsabsorption zu totalem Verschwinden der Tumoren führt, während bei anderen nur eine vorübergehende Verringerung des Wachstums auftritt? Scheinbar verbinden sich dabei zwei Faktoren, auf der einen Seite die Intensität der Reaktion (die entweder Eigenheiten des Tieres oder einer größeren oder kleineren Gewebsabsorption zuzuschreiben ist) und auf der anderen Seite die wechselnden biologischen Eigenschaften der wachsenden Tumorzellen. Der zweite dieser beiden Faktoren, obwohl seine Natur noch nicht ganz klar hervortritt, ist wahrscheinlich von gleicher Bedeutung wie der erste. Tatsächlich sind die Tumorzellen, welche (wie oben erwähnt) zu verschiedenen Zeiten biologisch verschieden sind, zu gewissen Zeiten ungünstigen Bedingungen gegenüber mehr, zu anderen Zeiten wieder weniger empfindlich. Die merkwürdigen Unter-

1) Cf. Roy. Soc. Proc., B., Vol. 79, 1906, loc. cit.

schiede der Resultate, wenn man große und kleine Dosen desselben Tumorstammes zu verschiedenen Zeiten impft, zeigt diese Verschiedenheit der Phasen auf eine Art; die Schwankungen des Prozentsatzes der Impfausbeute zeigen es uns auf eine andere Weise, und diese zeitweisen Schwankungen des Wachstums von einzelnen Impftumoren, die sofort nach der Impfung folgen, auf eine dritte Weise. Das verschiedene Verhalten von aus größeren oder kleineren Dosen entstandenen Tumoren und die zeitweilige Verminderung der Größe oder das Verschwinden nach anfänglichem Wachstum dürfen wohl zu den Absorptionseffekten von mehr oder weniger Tumormaterial gerechnet werden, die in einem Fall genügen, im anderen nicht, um eine spezifische Resistenzsteigerung des Tieres hervorzurufen. Die Art der Verschiedenheit zwischen Tumoren, die Transplantation mit großen Impfdosen vertragen, und denen, die dies nicht tun, ist bis jetzt gar nicht klar. Es ist nicht nur eine Verschiedenheit der Fähigkeit zu unabhängigem, individuellem Leben der Zellen; eine Annäherung der „cytotypischen“ Art des Wachstums — in R. Hertwigs Terminologie. Die Stärke der spezifischen Resistenz, die der Resorption derselben Mengen von verschiedenem Tumormaterial folgt, scheint von einem Stamm zum anderen zu wechseln, wie auch die Empfindlichkeit solcher Tumorzellen der veränderten Resistenz gegenüber, und es liegt auf der Hand, daß Verschiedenheiten dieser Art sich auch durch verschiedene Empfindlichkeit der Dosierung gegenüber manifestieren.

Dieser Vorgang, der als eine simultane aktive Immunisierung bezeichnet werden kann, darf vielleicht für den geringen Erfolgsprozentsatz bei primären Transplantationen sporadischer Tumoren auch teilweise verantwortlich gemacht werden. Die Proportion der Menge resorbierten Gewebes ist höher, das anfängliche Wachstum geringer, der mangelhaften Anpassungsfähigkeit entsprechend. Diese Wirkung von simultaner Immunisierung wird erhöht, wenn primäre Transplantation mit großen Dosen ausgeführt wird, und verringert, wenn ganz kleine Bruchteile eingeführt werden. Wenn Mäuse gegen den Impftumor natürlich resistent sind, wird die simultane Immunisierung diese Resistenz im hohen Grade steigern.

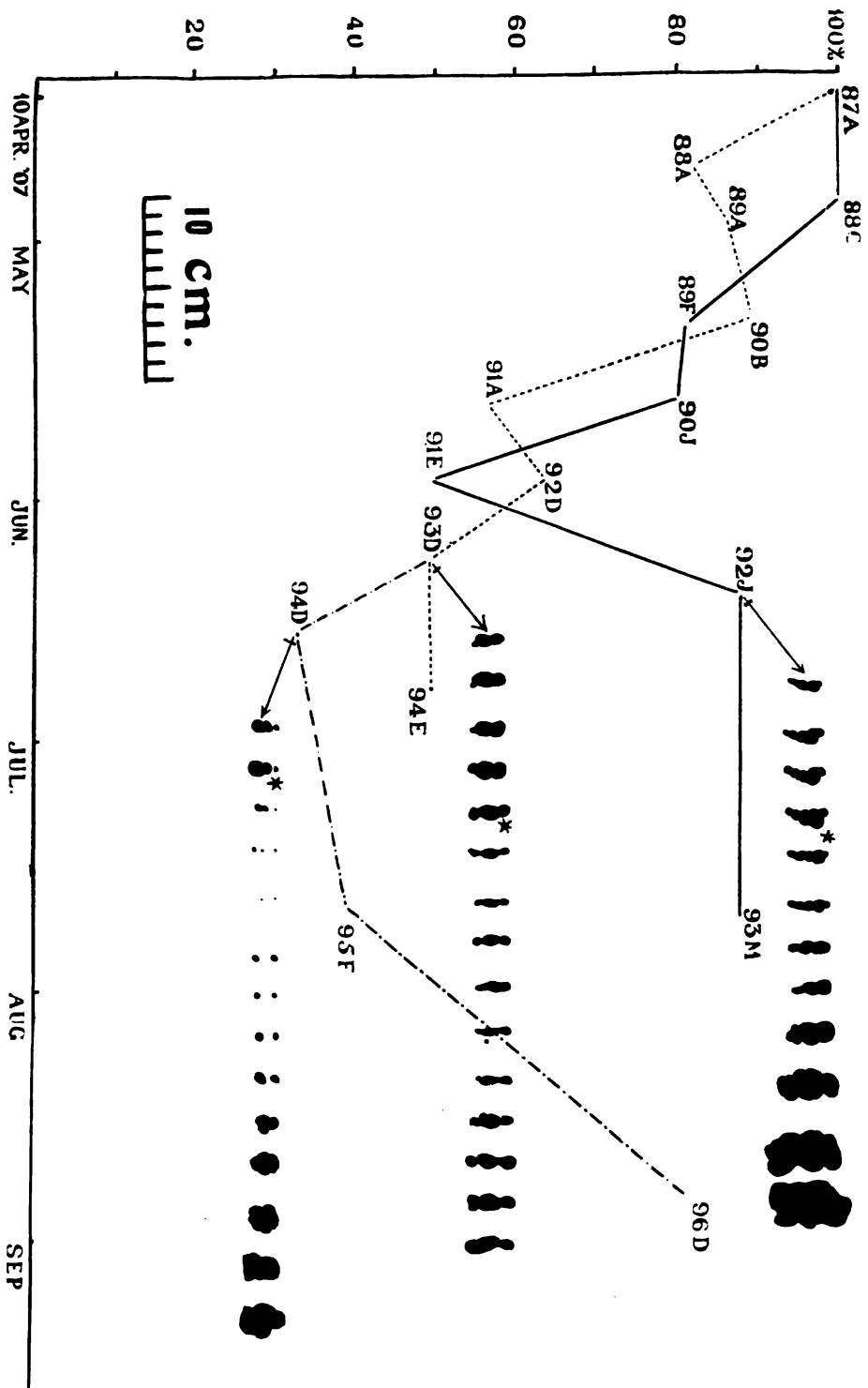


Fig. 23. Figurenerklärung siehe p. 487.



Vorübergehende Verringerung der Größe kommt auch bei großen Tumoren vor, aber lange nach der Periode, in welcher sich die Wirkungen der Tumorabsorption, wie oben beschrieben, manifestieren. Dies kommt viel seltener als das früher erwähnte Phänomen vor und ist nur zu sehen, wenn Tumoren für längere Zeit unter Beobachtung bleiben. Bei unseren Versuchen ist es gewöhnlich gleichzeitig mit der Verringerung der Größe, die zur spontanen Heilung der Schwestertumoren derselben Serien führt, aufgetreten, und war besonders ausgesprochen bei einem der Tumoren, von denen Clowes und Gaylord<sup>1)</sup> eine Karte veröffentlichten. Fig. 23 zeigt die Erscheinung bei einzelnen Tumoren des Jensenschen Carcinoms. Wenn die Fälle, die in einem Tumorstamm beobachtet wurden, mit Berücksichtigung der absoluten Fortpflanzungsdauer auf einer Prozentkurve aufgezeichnet werden, wie in Fig. 23, erweisen sie sich als merkwürdig gruppiert. Der Vorgang geht scheinbar gleichzeitig bei drei verschiedenen Stämmen desselben Tumors vor sich, von denen zwei einige Monate lang getrennt verpflanzt waren. Obgleich die Seltenheit des gleichzeitigen Auftretens dieses Phänomens bei solchen getrennten Stämmen die Möglichkeit des Zufalls sehr nahelegt, so läßt uns doch der ganze Charakter des Vorganges, verbunden mit dem, was wir schon eingehend mitgeteilt<sup>2)</sup> und oben erwähnt haben, sehr stark seine Abhängigkeit von periodischen Veränderungen der Parenchymzellen annehmen.

Die Prozentkurven der Impfausbeute verschiedener Tumorstämme zeigen insofern eine allgemeine Aehnlichkeit zueinander, als die Kurven einen auf- und absteigenden Kurs befolgen<sup>2)</sup>. Die Häufigkeit und Größe der Schwankungen variieren von

Fig. 23. Kombinierte Prozentkurve und Silhouettenkarte, um vorübergehende simultane Verkleinerungen von drei Jensenschen Impftumoren aus drei getrennten Serien, 92 J—, 93 D . . . , 94 D — . — . — , zu zeigen. In den Prozentkurven, welche die Abstammung der in Betracht kommenden Tumoren veranschaulichen, sind die Wachstumsilhouetten dreier einzelner Tumoren eingezeichnet in der Weise, daß das Datum, an welchem jede Silhouette gemacht war, den Ordinaten der Prozentkurve entspricht. Erste Chartierung 10 Tage nach der Impfung. Erstes Anzeichen der Rückbildung bei \*; erneuertes Wachstum in allen drei Tumoren fast gleichzeitig.

1) Surgery, Gynaecology and Obstetrics, June 1906, p. 2.

2) Experimental analysis of the growth of cancer, loc. cit.

einem zum anderen Tumorstamm, so daß das Allgemeinbild charakteristisch und ziemlich beständig für jeden Tumorstamm ist. Die Deutung dieser Verschiedenheiten, die man leicht beim Vergleichen verschiedener Tumorenkurven erkennen kann, ist nicht sofort einleuchtend. Die Wachstums-schnelligkeit der Tumoren ist nur zum Teil für Amplitude und Frequenz der Wellen verantwortlich zu machen. Es ist klar, daß ein rasch wachsender Tumor in viel kleineren Zwischenräumen verpflanzt werden kann als ein langsam wachsender und daß infolgedessen, wenn der Prozentsatz der Impfausbeute rasch wechselt, die Kurve steiles Fallen und Steigen anzeigen wird. Wir finden jedoch bei schnell wie bei langsam wachsenden Tumoren, daß die auf- resp. absteigende Phase jeder Kurvenwelle manchmal sich über mehrere aufeinanderfolgende Transplantationen erstreckt, und die Kurve unabhängig von der neuen Impfung ihren Verlauf fortsetzt. Die Länge der Zeit, über die sich die wechselnden Phasen erstrecken, scheint konstanter zu sein als die Zahl der Ueberimpfungen. Der Endschluß, den wir aus unseren Beobachtungen über das Wachstum verschiedener Tumorstämme ziehen können, ist der, daß die Dauer der wechselnden Phasen von verringerter und vermehrter Wachstumsenergie ein immanenter Charakter der Parenchymzellen ist von analoger Art wie die Beständigkeit ihrer histologischen Struktur. Dieselben Schlüsse mögen aus der wechselnden Amplitude der Schwingungen in den verschiedenen Tumorstämmen gezogen werden. Tumoren, die gewöhnlich eine mäßige Impfausbeute geben — nicht immer die, welche am langsamsten wachsen — können natürlich nicht zwischen solch weiten Grenzen schwanken wie die, die selten, oder häufig, einen Maximalprozentsatz von Erfolg ergeben. Es gibt bis jetzt noch unbekannte biologische Eigentümlichkeiten der Tumorzellen, die sich nur auf diese Weise enthüllen.

Das Aussehen der Kurven wird nur in geringem Maße durch Zufälligkeiten der experimentellen Methode bestimmt. Auch durch Doppelimpfungen treten diese Schwankungen der Impfausbeute als Zeichen wechselnder Eigenschaften der Tumorzellen deutlich hervor in einer Weise welche ihre Unabhängigkeit von dem Wirtstiere demonstriert. Bashford,

Murray und Cramer haben gefunden<sup>1)</sup>, und Borrel und Bridré<sup>2)</sup> haben die Beobachtung bestätigt, daß, wenn eine große Zahl von Mäusen gleichzeitig rechts und links mit Tumoren von verschiedener Angangsfähigkeit geimpft wird, die Zahl der angegangenen Tumoren derjenigen der Kontrollimpfungen der betreffenden Tumoren in getrennten Serien entspricht. Die Fortpflanzung der betreffenden Stämme durch aufeinander folgende Doppelimpfungen kann über längere Zeiten hin in ähnlicher Weise fortgesetzt werden, und dabei ergibt sich, daß die Prozentsätze der Impfausbeute der zwei Tumorstämme in denselben Mäusen unabhängig voneinander wie in parallelen Einzelimpfungen schwanken.

In einer Anzahl früherer Aufsätze<sup>3)</sup> ist die Aufmerksamkeit auf die eben erwähnte Schlußfolgerung gelenkt worden, ohne daß dadurch, vielleicht weil die Nachahmung unserer Versuche eine sehr mühselige sein dürfte, andere Forscher zu ebenso eingehenden Beobachtungen angeregt worden sind. Dieses Resultat ist aber nicht nur durch unsere späteren Beobachtungen bestätigt worden, sondern auch durch andere Forscher, z. B. Hertwig und Poll, Carl Lewin, durch die von Borrel und Bridré veröffentlichten Prozentsätze und den Stammbaum eines Pariser Tumors, durch Flexner und Jobling und nach einer brieflichen Mitteilung durch Eloesser in Czernys Institut in Heidelberg. Ganz kürzlich ist es auch von Calkins<sup>4)</sup> durch eine Prozentsatzkurve der Fortpflanzung des Brooklyn-Tumorstammes im Laboratorium zu Buffalo U.S.A. bestätigt worden. Diese Kurve zeigt dieselben Eigenheiten wie jene, die in diesem und früheren Aufsätzen beschrieben worden sind. Calkins versucht mittels einer zweiten in seiner Arbeit reproduzierten Kurve zu beweisen, daß die Schwankungen der Prozentsätze der Impfausbeute unabhängig von der Wachstumsenergie der Krebszellen sind. Um die letztere zu messen, nimmt er die ungefähre Zeit in Tagen, die die Tumoren jeder Generation brauchten, um

1) Natural and induced resistance to the growth of Cancer. Roy. Soc. Proc., B, Vol. 79, p. 175, 6. Dez. 1906.

2) loc. cit. p. 481.

3) loc. cit. p. 483.

4) Journal of experimental Medicine, May 1908.

die Mäuse zu töten. Wie wir immer angenommen haben<sup>1)</sup>, kann die Angangsfähigkeit nur als ein willkürlicher Maßstab für die Wachstumsenergie angesehen werden, und in dieser Veröffentlichung zeigen wir, daß von Stamm zu Stamm die Angangsfähigkeit unabhängig von der Wachstumsenergie sich ändert, daß aber in jedem einzelnen Stamm eine ausgeprägte, wenn auch nicht absolute, Parallele zwischen beiden besteht.

Eine genauere Methode, um die Wachstumsenergie zu messen, besteht darin, daß die Größe der Tumoren einer Reihe in regelmäßigen Zeitintervallen als Silhouette gezeichnet und der Flächeninhalt davon benutzt wird, um eine Kurve zu konstruieren<sup>2)</sup>. Auch ist es möglich, eine noch objektivere Messung zu erhalten, wenn man große Mengen Tumortiere in regelmäßigen Zwischenräumen tötet und die produzierte Gewebsmenge wiegt. Jede dieser Methoden wird ein korrekteres Messen der Wachstumsenergie zulassen als die von Calkins adoptierte, die unkontrollierte Fehler einschließt, da der Tod des Tieres ein sekundäres Resultat des Wachstums ist und von allerlei Faktoren beeinflusst werden kann. Nichtsdestoweniger zeigt Calkins' Kurve dieselbe Parallele zwischen Angangsfähigkeit und Wachstumsenergie, denn auch in ihr ist der Zeitraum, innerhalb welches die Mäuse sterben, kürzer, je höher die Impfausbeute ist. — Wir verstehen deshalb durchaus nicht, wie Calkins zu einem anderen Schluß kommt, und finden weder in unseren noch in seinen Ergebnissen irgendwelchen Beweis für die Annahme, daß die Schwankungen der Impfausbeute durch zyklisch auftretende Veränderungen in einem intracellulären Parasiten hervorgerufen werden. Die Angangsfähigkeit „Infektivität“ zu nennen, heißt nur, den Tatsachen einen anderen Namen geben und ihr Verständnis durch eine zweifelhafte Analogie zu verdunkeln.

Wenn es auch augenblicklich nicht ratsam ist, irgendwelche Theorie über die Natur des Mechanismus dieser Schwankungen<sup>3)</sup>

1) Roy. Soc. Proc., B, Vol. 78, p. 199 usw.

2) Contributions to the study of the development of sarcoma under experimental conditions. (Third Scientific Report of the Imperial Cancer Research, p. 204 und Fig. 40.)

3) Diese Schwankungen lassen sich durchaus nicht mit den von Bashford und Murray mit Vorbehalt aufgestellten, aber längst aufs

und ihrer Verwandtschaft zum Metabolismus des Krebses aufzubauen, so zeigt doch ihre Ubiquität, vier Tumoren ausgenommen, die anscheinend stets mit 90—100 Proz. angehen, vielleicht bei jedem Stamm, den wir studiert haben und bei den meisten von anderen studierten, ihre große Bedeutung. Wenn wir mögliche Zufälligkeiten berücksichtigen, so scheint doch das allgemeine Endergebnis dies zu sein, daß die Größe und Häufigkeit der Schwankungen der Wachstumsenergie bei denjenigen von unseren Tumorstämmen am größten sind, die am raschesten wachsen. Es ist augenblicklich sehr schwer, Versuche zu planen, die es uns möglich machen würden, tiefer in die Natur dieses Prozesses einzudringen. Wir halten es für möglich, daß die Wachstumsenergie von der Schnelligkeit, mit der diese Phasen im Leben der Zellen aufeinander folgen, abhängt. Dann wäre ein Fingerzeig gegeben betreffend die Natur der Zelltransformation, die bei der Genese des Krebses eine Rolle spielt, und wie dieselbe ihr scheinbar fortdauerndes (vegetatives) Wachstum aufrecht erhält.

### 7. Beziehungen zum Krebs des Menschen.

Unsere eigenen Untersuchungen und die anderer Forscher sind hauptsächlich mit der Absicht ausgeführt worden, die Faktoren zu beleuchten, die das Wachstum der Krebszellen im lebenden Körper fördern und hindern. Die künstliche Fortpflanzung ist viel weniger als Mittel, Licht auf die Natur der Krebswucherung selbst zu werfen, angewandt worden. Das fortdauernde Wachsen der Zellen, das bei dieser Forschungsmethode zutage tritt, ist gewöhnlich als etwas, was keine weitere Analyse gestattet, angesehen worden, quasi eine prinzipielle Eigenschaft der lebendigen Moleküle. Die künstliche Verpflanzung des Krebses aber gestattet nicht nur eine detaillierte Analyse der für das Wachstum günstigen oder ungünstigen Bedingungen, sondern sie läßt uns auch eine Analyse der scheinbar fortdauernden Wucherung selbst zu.

---

kategorischste zurückgenommenen Arbeitshypothese einer auf heterotypische Kernteilung nachfolgenden Kernkopulation vereinigen. Vide Proc. Roy. Soc., B, Vol. 77, 1906: Second Scientific Report of Imperial Cancer Research, 1905, usw.

Die Verschiedenheiten 1) des Erfolgsprozentsatzes, wenn ein spontaner oder ein transplantabler Tumor zu verschiedenen Zeiten verpflanzt wird, 2) der Wachstumsschnelligkeit des transplantierten Tumors, 3) der Empfindlichkeit gegen Veränderungen der Impfdosis und 4) gegen simultane Immunisierung, und wir mögen auch noch 5) die Leichtigkeit, mit welcher die Ueberimpfung auf fremde Rassen vollführt werden kann, hinzufügen, haben alle das gemeinsam, daß sie zum großen Teil durch Verschiedenheiten der Zellen zu verschiedenen Zeiten bedingt werden. Die Beobachtungen weisen darauf hin, daß diese Verschiedenheiten durch Wechseln negativer und positiver Phasen der Wachstumsenergie der Krebszellen erzeugt werden. Dieser Wechsel der Wachstumsenergie, der durch experimentelle Untersuchungen klargelegt ist, scheint von fundamentaler Bedeutung für ein besseres Verständnis der Krankheit zu sein. Eigenschaften der Zellen sind enthüllt worden, welche bei dem Studium des Menschenkrebses nicht zur Verwertung kamen, weil sie in dem verwickelten klinischen Verlauf der Krankheit fast völlig verdeckt, und in den Hintergrund gedrängt waren, so daß man sie mit größtem Mißtrauen betrachtete. Dieser Wechsel der Wachstumsenergie erschließt uns Phänomene, die häufig beim Verlauf der bösartigen Geschwülste beim Menschen beobachtet worden sind, nämlich daß Tumoren, obgleich sie im allgemeinen fortschreitend wachsen, Perioden von Besserung und Verschlimmerung zeigen, entweder im primären Tumor oder in seinen Metastasen. Sie erlauben uns auch präzisere Begriffe über den Grund für die Spontanheilung partiell entfernter Tumoren oder solcher, die als chirurgisch inoperabel sich selbst überlassen wurden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Krebszelle in den negativen Wachstumsphasen gegen allerlei schädigende Einflüsse empfindlicher ist; insbesondere gegen die durch Absorption homologen krebsigen Gewebes hervorgerufenen Modifikationen des Wirtstieres, zu denen wir uns jetzt wenden.

## Zweiter Teil.

### Wachstumshemmende und -fördernde Einflüsse.

Die experimentelle Uebertragung von Tierkrebs von Tier auf Tier, hat die Möglichkeit geschaffen, die Wachstumsbedingungen maligner Tumoren näher zu studieren. Insbesondere ist solchen das Wachstum hemmenden Bedingungen von allen Forschern spezielle Aufmerksamkeit gewidmet worden, in der Hoffnung, eine rationelle Therapie der menschlichen malignen Tumoren zu befördern.

In dieser Verbindung darf aber die Differenz nicht vergessen werden, die zwischen der Genese maligner Proliferation in dem spontan erkrankten Tiere und dem späteren kontinuierlichen Wachstum der Krebszellen, sowohl in dem spontan erkrankten Tiere als auch in normalen geimpften Tieren besteht. Obwohl in dem Folgenden die Ausdrücke „Immunität“, „immune“ Mäuse etc. häufig benutzt werden, geschieht dies nur der Bequemlichkeit halber und muß in keinem Falle mit einer herabgesetzten Disposition für die Entwicklung spontaner Krebse identifiziert werden. Diese Worte bedeuten nur, daß die Tiere so modifiziert worden sind, daß die Inokulation von intakten Tumorzellen in diesen Tieren kein Geschwulstwachstum hervorruft.

Bei der Besprechung der allgemeinen Resultate der Transplantation von Mäusetumoren ist schon die Bedeutung technischer Details betont worden. Alles, was da gesagt worden ist, bezieht sich in noch höherem Grade auf Experimente, die Wachstumsunterschiede in auf verschiedene Weise behandelten Tieren zeigen sollen. Es ist in allen solchen Experimenten unumgänglich nötig, daß die vorbehandelten Tiere in Rasse, Alter, Gewicht und allgemeiner Gesundheit mit den Kontrolltieren genau übereinstimmen. Weiter muß das Inokulationsmaterial so gleichmäßig wie möglich unter die Tiere verteilt werden. Zu diesem Zweck muß die Inokulationsstelle und die inokulierte Dosis identisch sein und die letztere genau gemessen werden. Wenn die Impfung mit Hohlnadel und Stilet geschieht, wird eine gleichmäßige Dosierung durch eine sorgfältige Auswahl der Stückchen erreicht. Wenn die Spritzenmethode gebraucht wird, muß die Tumoremulsion so

gleichmäßig wie möglich sein und durch scharfe schneidende Instrumente, und nicht durch Zerquetschen hergestellt werden. Die Dosierung mit der Spritzenmethode geschieht durch Messung des Volums, und wenn dieses klein ist, ist es von Bedeutung, die kleinste Nadel zu gebrauchen, die die Stückchen der Emulsion passieren läßt.

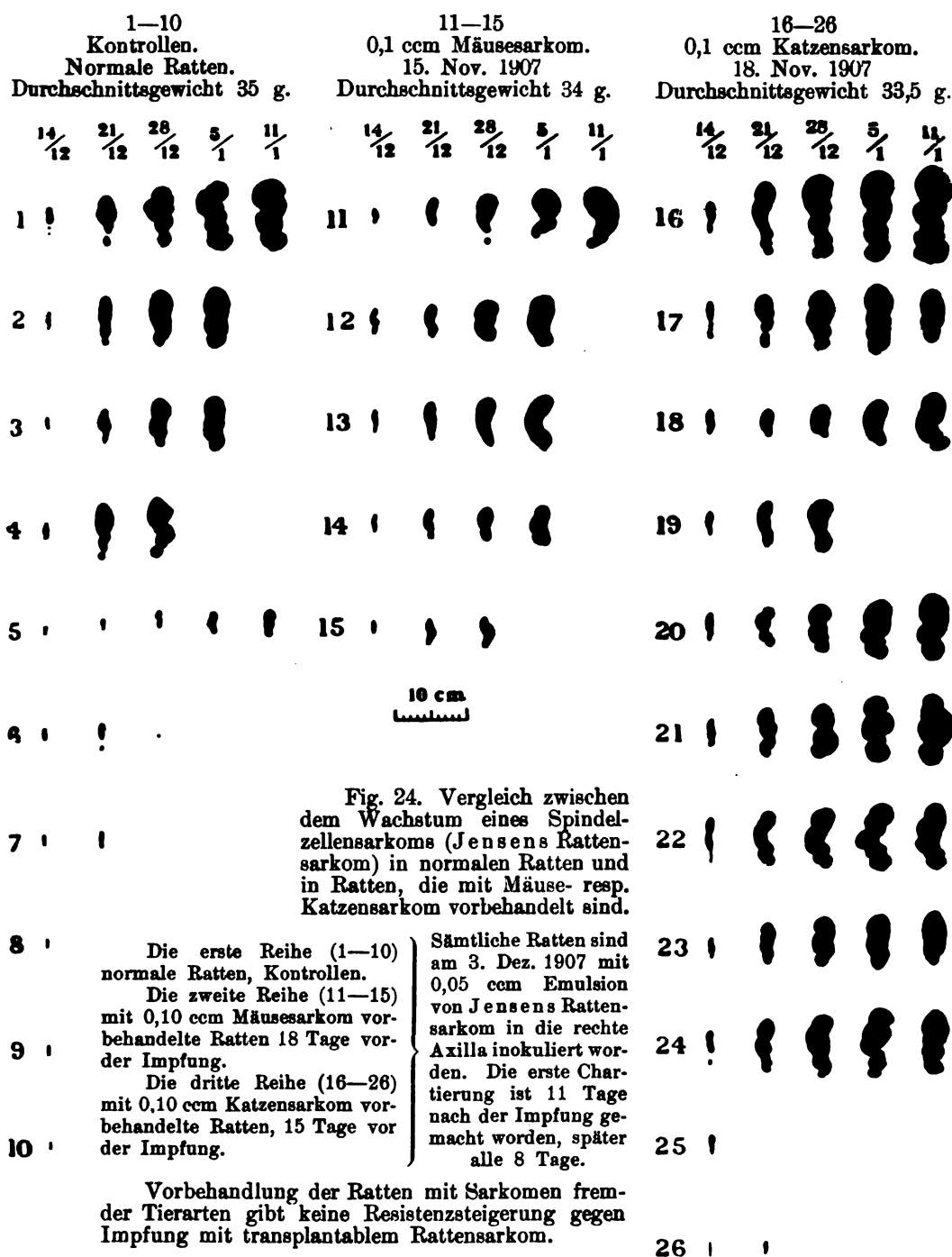
Die Quantität der immunisierenden Substanzen muß sehr genau angegeben werden. Es ist einleuchtend, daß es unmöglich sein würde, die Schutzwirkung zweier verschiedenen Gewebe (z. B. normaler und krebsiger) zu vergleichen, wenn ungleiche und nicht gemessene Mengen beider eingeführt worden sind. Das Zeitintervall zwischen der vorausgehenden Behandlung und der prüfenden Geschwulstimpfung muß auch genau angegeben werden. Die Bedeutung des letzteren geht aus den in Fig. 34 und 36 wiedergegebenen Versuchen hervor. Es ist kaum zweifelhaft, daß, wenn die Experimente verschiedener Forscher auf diese Weise genau protokolliert werden können, manche von den anscheinenden Widersprüchen verschwinden werden.

Es ist wünschenswert, die Bedeutung zufälliger individueller Verschiedenheiten in der Empfänglichkeit der Tiere für Geschwulstimpfung zu erwägen. Die negativen Resultate nach der Impfung werden gewöhnlicherweise natürlicher Resistenz der Tiere zugeschrieben. Wahrscheinlich werden genauere Begriffe die unbestimmten Ausdrücke „natürliche Resistenz“ oder „Immunität“ oder „Athrepsie“ substituieren müssen, um das wechselnde numerische Verhältnis von positiven und negativen Impfresultaten bei verschiedenen Geschwulststämmen zu erklären, wie schon früher betont worden ist (p. 483). Unter Berücksichtigung der nötigen Vorsichtsmaßregeln, und wenn eine genügend große Anzahl von Tieren inokuliert worden ist, sind die Resultate der Experimente hierdurch nicht wesentlich beeinträchtigt.

Daß eine negative Impfausbeute in normalen Tieren aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch normalerweise schon vorhandene Antikörper im Serum bedingt ist, zeigt sich dadurch, daß für die Transplantation von Spontantumoren kleine Dosen bessere Ausbeute als große Dosen geben.

Auf das Postulat von Hertwig und Poll, daß der Unterschied in der Impfausbeute zwischen vorbehandelten und





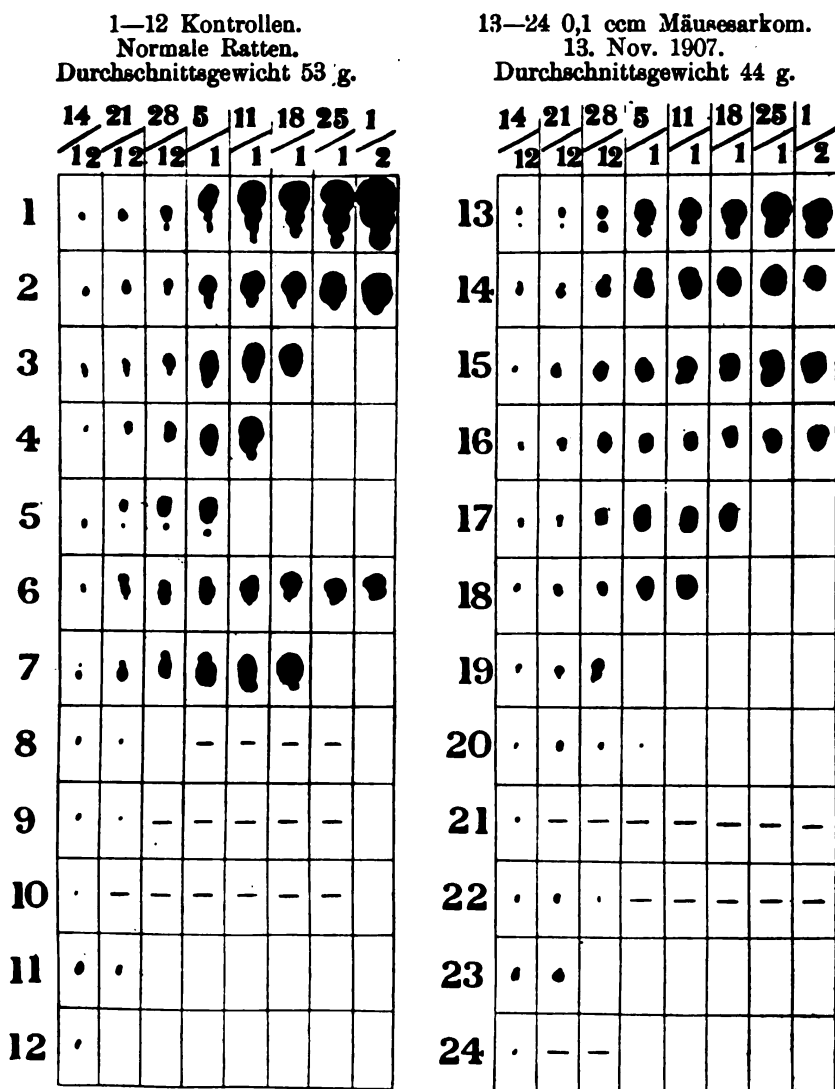


Fig. 25. Vergleich zwischen dem Wachstum des Flexnerschen Rattencarcinoms in normalen Ratten und in Ratten, die mit Mäuse- resp. Katzensarkom vorbehandelt worden sind.

Die erste Reihe (1—12) normale Ratten, Kontrollen.

Die zweite Reihe (13—24) mit Mäusesarkom vorbehandelte Ratten, 0,10 ccm subkutan am Rücken, 19 Tage vor der Impfung.

Die dritte Reihe (25—35) mit Katzensarkom vorbehandelte Ratten, 0,10 ccm subkutan am Rücken, 14 Tage vor der Impfung.

Keine Resistenzsteigerung durch Vorbehandlung mit Tumoren fremder Tierarten.

Sämtliche Ratten sind am 2. Dez. 1907 mit 0,02 g Rattencarcinom in die rechte Axilla geimpft worden.

25—35 0,1 ccm Katzensarkom.  
18. Nov. 1907.

Durchschnittsgewicht 42 g.

	14	21	28	5	11	18	25	1
	12	12	12	1	1	1	1	2
25	:	:	!	!	!	!	!	!
26	.	.	.	.	.	.	.	.
27	.	.	.	.	.	.	.	.
28	.	.	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.	.	.
30	.	.	.	.	.	.	.	.
31	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.
33	.	.	.	.	.	.	.	.
34	.	.	.	.	.	.	.	.
35	.	.	.	.	.	.	.	.

10 cm.



normalen Mäusen nur durch unkontrollierbare zufällige Unterschiede in natürlicher Resistenz bedingt ist, brauchen wir hier nicht einzugehen, um so weniger, als Ehrlich schon das Unhaltbare dieser Ausführungen gezeigt hat <sup>1)</sup>.

Um die Notwendigkeit von genauer Dosierung und ihrer Bedeutung für Immunitäts-experimente wieder hervorzuheben, sei auf das p. 387 u. ff. Gesagte und Fig. 19 und 20 verwiesen.

In unseren Experimenten haben wir Dosen von sehr verschiedener Größe gebraucht. Es ist kaum vorteilhaft für praktische Zwecke, mehr als 0,2 ccm Gewebsemulsion oder mehr als 0,5 ccm defibrinierten Blutes zu inokulieren, da bei größeren Gaben die Gefahr sekundärer Infektion steigt und solche Serien überhaupt nicht gebraucht werden können.

Es ist von gewissem Vorteil, eine Dosis immunisierender Substanzen zu wählen, die eben genügt, um nachweisbare

Resistenz hervorzurufen, ohne ihre spezifische Natur oder die quantitativen Beziehungen, die zwischen der Menge der immunisierenden Substanz und dem Grad der erhaltenen Resistenz bestehen, zu verwischen.

Die in diesem Aufsatz gegebenen Versuchsprotokolle sind als typische Beispiele aus einer großen Anzahl ausgewählt.

1) Die Genese des Carcinoms. Verh. d. Deutsch. Path. Ges. zu Kiel 1908.

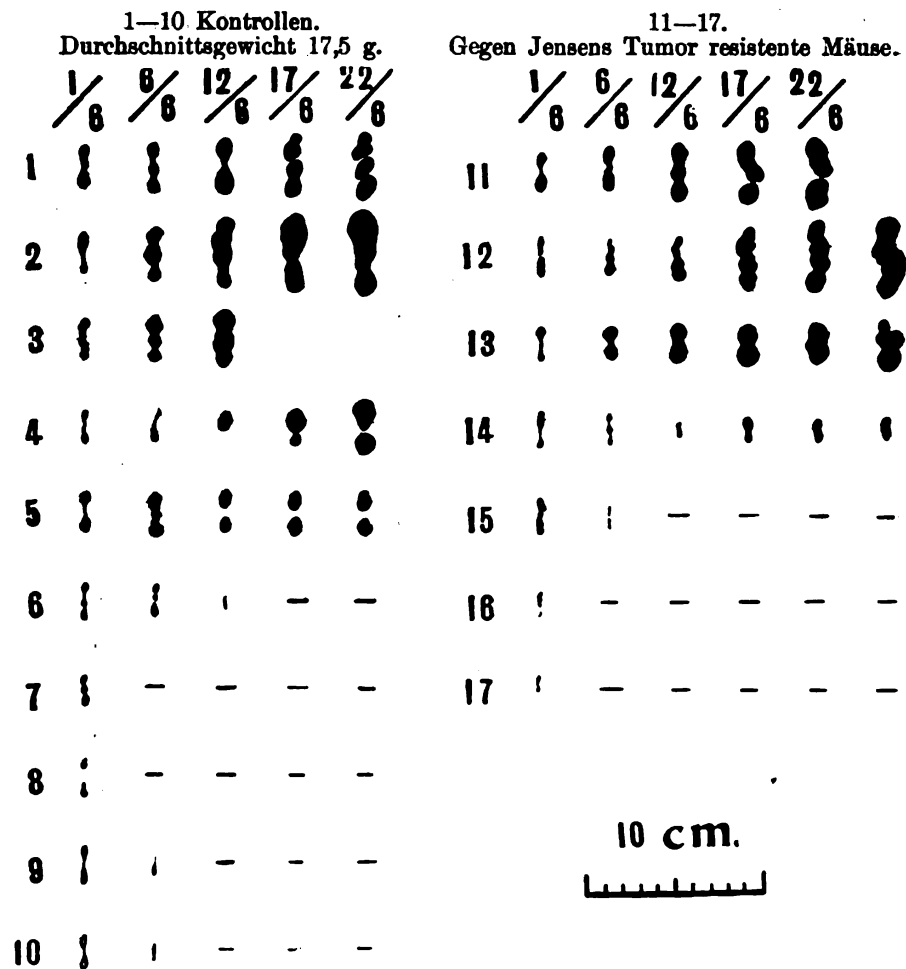


Fig. 26. Exp. 32/9 J. Vergleich zwischen dem Wachstum eines transplantierbaren Plattenepithelcarcinoms der Maus (Tumor 32) in normalen Mäusen und in gegen Jensens Carcinom immunisierten Mäusen, zugleich in solchen, die gegen ein Adenocarcinom der Mamma (Tumor 37) resistent waren.

Die erste Reihe (1—10) normale Mäuse, Kontrollen.

Die zweite Reihe (11—17) gegen Jensens Carcinom resistente Mäuse, die noch eine Injektion von 0,25 ccm Jensens Carcinom 4 Wochen vor der Impfung bekommen hatten.

Die dritte Reihe (18—31) gegen ein Adenocarcinom der Mamma (Tumor 37) resistente Mäuse.

Alle Mäuse sind am 22. Mai 1907 mit 0,05 ccm Plattenepithelkrebs in die linke Axilla injiziert worden.

Der Plattenepithelkrebs wächst in diesem Versuch beinahe ebenso gut in gegen Jensens Tumor resistenten Mäusen wie in normalen Mäusen und nur wenig schlechter in den gegen Adenocarcinom der Mamma resistenten Mäusen.

18—31.  
Gegen Tumor 37 resistente Mäuse.

	1/6	6/6	12/6	17/6	22/6
18	!	!	!	!	!
19	-	-	-	-	-
20	!	!	!	!	!
21	!	-	-	-	-
22	!	-	-	-	-
23	!	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-

und vorbehandelten Tieren zu nicht zu konstatieren. Fig. 25

In dieser Weise kann viel wörtliche Beschreibung vermieden und gleichzeitig der Wert des Beweismaterials auch denen zugänglich gemacht werden, die selbst keine persönliche Erfahrung über experimentelle Tumoren besitzen.

### 1. Artspezifität der Resistenz nach Tumorresorption.

Eine deutlich gesteigerte Resistenz gegen nachfolgende Tumorigenität ist nur durch Vorimpfung mit Geschwulstmaterial von derselben Tier-species zu erreichen. Resorption von Rattengeschwülsten schützt Mäuse nicht gegen nachfolgende Impfung mit Mäusegeschwülsten, und mit Mäusetumoren vorbehandelte Ratten sind gegen Impfung mit transplantierbaren Rattentumoren nicht resistent. Fig. 24 und 25 zeigen die Anordnung und das Resultat solcher Versuche. In Fig. 24 sind (1—10) normale Ratten (11—15) mit Mäusesarkom und (16—26) mit Katzensarkom vor 18 resp. 15 Tagen vorbehandelt. Sie sind sämtlich mit Jensens Rattensarkom injiziert worden (Dosis 0,05 ccm). Ein Unterschied in der Tumorentwicklung zwischen den normalen und vorbehandelten Tieren zu Ungunsten der letzteren ist nicht zu konstatieren. Fig. 25 zeigt, daß auf dieselbe Weise

vorbehandelte Ratten gegen die Nachimpfung mit Flexners Rattencarcinom gar nicht refraktär sind. Wenn wir quantitativ arbeiten, sind wir also nicht imstande, mit Geschwulstmaterial von anderen Tierarten eine Resistenz gegen Tumoringpfung zu produzieren oder, wo eine solche schon vorhanden ist, dieselbe zu steigern.

## 2. Gewebsspezifizität der Resistenz nach Tumorresorption.

Die auf Resorption von Tumormaterial folgende Resistenz ist am größten gegen spätere Nachimpfung mit demselben Tumor, dagegen weniger ausgesprochen gegen andere Tumoren von ähnlicher Histogenese und noch weniger gegen Tumoren von verschiedener Histogenese. Während die Schutzwirkung gegen denselben Tumor, der für die erste Impfung gebraucht worden war, in den meisten Fällen sehr groß und oft komplett ist, ist sie selten gegen einen anderen Tumor sehr ausgeprägt, selbst wenn der letztere in den Kontrolltieren schlechter wächst, als der Tumor, gegen welchen der Schutz absolut ist. Fig. 26, 27 und 28 illustrieren dies Verhältnis. In Ehrlichs Versuchen schien die Schutzwirkung allgemeiner Natur zu sein, und von gleicher Stärke selbst zwischen Carcinom und Sarkom; er hat deshalb dieser allgemein erscheinenden Protektion den Namen Panimmunität gegeben. Während wir ihre Existenz als eine durch Mäusegewebe hervorgerufene allgemeine Resistenzsteigerung zugeben, halten wir doch daran fest, daß es außerdem nach Resorption eines Tumors eine noch stärkere Protektion gibt, die spezifisch ist und hauptsächlich gegen ihn selbst gerichtet, wie genaue quantitative Versuche mit gleichzeitiger Berücksichtigung des Alters der Tiere es zeigen.

Ehrlich zeigte, daß die Resorption von größeren Mengen von Spontantumoremulsion eine deutliche Resistenzsteigerung gegen nachfolgende Geschwulstimpfung hervorrief. In den Fällen, in welchen große Dosen von Spontantumoren injiziert worden sind, können wir die Ehrlichsche Beobachtung bestätigen. Wenn aber die immunisierende Dosis nicht größer als 0,10 ccm ist, ist der Effekt oft sehr geringfügig, und gelegentlich, wenn die zweite Inokulation erst nach einem größeren Zeitintervall folgt, kann Hypersensibilität beobachtet werden. Wenn wir diese Schutzwirkung der Spontantumoren mit dem

# Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung.

Durchschnittsgewicht der Mäuse 13,3 g.

501

9,5 g.

1-3 aus Exp. 32/17 B  
21. Sept. 07 Dosis 0,025.  
67 Proz. Impfausbeute.

4-9 aus Exp. 32/17 D  
27. Sept. 07 Dosis 0,025.  
47 Proz. Impfausbeute.

	1/10	8/10	15/10	29/10		11/11	16/11	21/11
	r	r	r	r		l	l	l
1	!	.	-	-		!	!	!
2	!	.	.	-		!	!	!
3	!	:	-	-		!	!	!
4	!	!	!	-		!	!	.
5	!	:	-	-		!		
6	!	:	-	-		-	-	-
7	!	.	-	-		!	!	!
8	!	-	-	-		!	!	!
9	!	-	-	-		-	-	-

	11/11	16/11	21/11
	l	l	l
10	!	!	!
11	!	!	!
12	!	.	!
13	!	!	
14	!	!	!
15	!	!	
16	!	!	
17	!	.	!
18	!	!	!
19	!	!	!
20	!	!	!
21	!	!	
22	!	.	-
23	!	-	-
24	!	-	
25	:	-	
26	-	-	-

Fig. 27. Exp. 37 sarc./14 E.  
Wachstum eines Spindelzellen-  
sarkoms in. Mäusen, die gegen  
Plattenepithelkrebs resistent sind, mit dem Wachs-  
tum in normalen Mäusen verglichen.

10 cm.

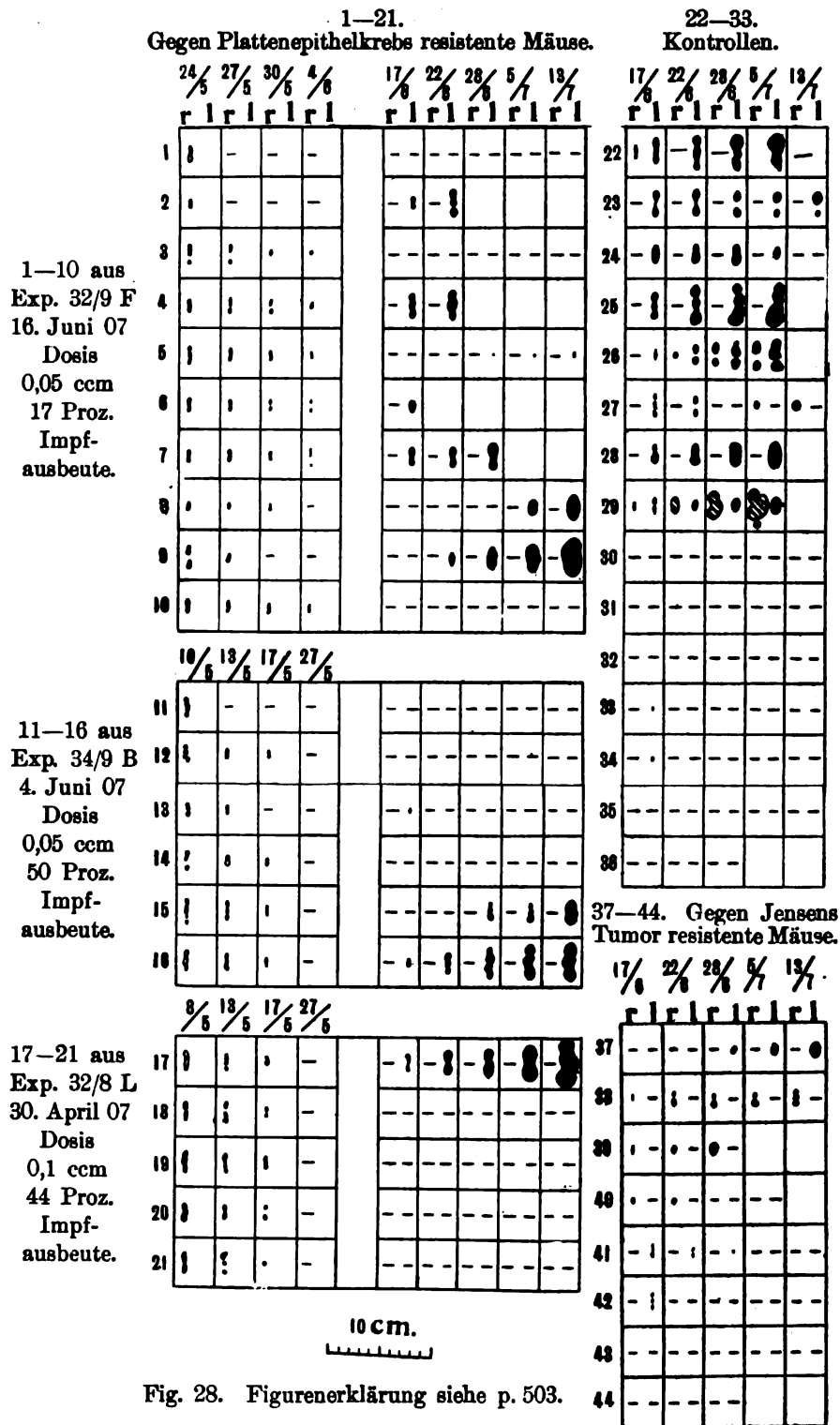


Die erste Reihe (1-9) sind Mäuse, in welchen der Plattenepithelkrebs nach einem vorübergehenden Wachstum (in den vier ersten vertikalen Reihen des Protokolls wiedergegeben) zu Resorption gekommen sind; ca. 1 Monat später sind dieselben Mäuse mit Sarkom in die andere Axilla geimpft. Das Wachstum des Sarkoms unter 11/11-16/11-21/11 nachzusehen.

Die zweite Reihe (10-26) normale Mäuse, Kontrollen.

Sämtliche Mäuse sind am 1. Nov. 1907 mit 0,025 cem Sarkomemulsion in die linke Axilla injiziert worden. Die erste Charakterisierung des Sarkomwachstums 10 Tage später, am 11. Nov. 1907. r = rechts; l = links.

Spindelzellensarkom wächst ganz gut in Mäusen, die sich gegen Plattenepithelkrebs erwiesen.





immunisatorischen Effekt derselben Gaben von normalen Geweben vergleichen, wie in später erwähnten Versuchen, kann der Schluß mit großer Wahrscheinlichkeit gezogen werden, daß der Spontantumor eher wegen seiner Eigenschaften als Mäusegewebe denn als Krebs wirksam ist.

### 3. Gewebsspezifität der Resistenz nach Resorption von normalen Geweben.

Vorbehandlung mit normalen Geweben kann die Empfänglichkeit für nachfolgende Tumorimpfung herabsetzen.

In den schon im Jahre 1904 angestellten Versuchen mit Normalgeweben haben anfangs Bashford, Murray und Cramer die Hauptaufmerksamkeit auf die Wirkungen der Mäuseblutabsorption bei normalen Mäusen gelenkt, nicht nur wegen der Schwierigkeit des Arbeitens mit anderen Geweben, sondern auch wegen der Beobachtung, daß Hämorrhagien häufig während des Heilungsprozesses der Tumoren nach Bestrahlung mit Radium und während Spontanheilung auftraten. Eine Anzahl hämorrhagischer Tumoren, die zuerst gut angegangen waren, wurden als besonders zu Spontanheilung neigend befunden, in diesem Falle wäre dieser Umstand mit dem wohlbekannten Faktor im menschlichen Chorion-Epithelioma vergleichbar.

Diese Versuche mit normalem Gewebe zeigten, daß normales Mäuseblut gegen Impfung mit Jensens Carcinom schützte (Annual Report of Imp. Cancer Research Fund, July

Fig. 28. Illustriert die Spezifität der Resistenz nach Resorption von Tumorgewebe. Wenn zwei Gruppen von Mäusen, die je mit einem von zwei verschiedenen Tumoren vorbehandelt worden sind, nachher gleichzeitig mit den beiden Tumoren geimpft werden, zeigen sich die Mäuse hauptsächlich nur gegen denselben Tumor geschützt, mit welchem sie vorbehandelt waren, während gegen den anderen Tumor keine Resistenz zu bestehen braucht.

Die erste Gruppe (1—26) Mäuse, in welchen Plattenepithelkrebs nach vorübergehendem Wachstum zur Resorption gekommen ist (die ersten 4 vertikalen Reihen unter  $\frac{24}{5}$  bis  $\frac{4}{5}$  zeigen dieses Wachstum).

Die zweite Gruppe (22—36) normale Mäuse, Kontrollen.

Die dritte Gruppe (37—44) Mäuse, in welchen Jensens Tumor nach vorübergehendem Wachstum resorbiert worden ist.

Sämtliche Mäuse sind am 7. Juni. 1907 gleichzeitig mit 0,025 ccm Plattenepithelkrebs (Tumor 32) in die rechte Axilla (r.) und mit 0,025 ccm Jensens Carcinom in die linke Axilla (l.) geimpft worden. Die Plattenepitheltumoren sind im Protokoll schraffiert, das Jensensche Carcinom ganzschwarz bezeichnet.

Durchschnittsgewicht der Mäuse

14,2 g.                      13,5 g.                      15,3 g.

	9/	15/	22/		9/	15/	22/		9/	15/	22/
1	•	•	•	31	•	•	•	60	•	•	•
2	•	•	•	32	•	•	•	61	•	•	•
3	•	•	•	33	•	•	•	62	•	•	•
4	•	•	•	34	•	•	•	63	•	•	•
5	•	•	•	35	•	•	•	64	•	•	•
6	•	•	•	36	•	•	•	65	•	•	•
7	•	•	•	37	•	•	•	66	•	•	•
8	•	•	•	38	•	•	•	67	•	•	•
9	•	•	•	39	•	•	•	68	•	•	•
10	•	•	•	40	•	•	•	69	•	•	•
11	•	•	•	41	•	•	•	70	•	•	•
12	•	•	•	42	•	•	•	71	•	•	•
13	•	•	•	43	•	•	•	72	•	•	•
14	•	•	•	44	•	•	•	73	•	•	•
15	•	•	•	45	•	•	•	74	•	•	•
16	•	•	•	46	•	•	•	75	•	•	•
17	•	•	•	47	•	•	•				
18	•	•	•	48	•	•	•				
19	•	•	•	49	•	•	•				
20	•	•	•	50	•	•	•				
21	•	•	•	51	•	•	•				
22	•	•	•	52	•	•	•				
23	•	•	•	53	•	•	•				
24	•	•	•	54	•	•	•				
25	•	•	•	55	•	•	•				
26	•	•	•	56	•	•	•				
27	•	•	•	57	•	•	•				
28	•	•	•	58	•	•	•				
29	•	•	•	59	•	•	•				
30	•	•	•								

10cm.



Fig. 29. Resistenz gegen Jensens Carcinom nach Vorbehandlung mit defibriniertem Mäuseblut, jedoch nicht nach Vorbehandlung mit defibriniertem Kaninchenblut.

Die erste Reihe (1—30) Mäuse, denen 11 Tage vor der Impfung je 0,50 ccm defibriniertes Mäuseblut unter die Haut des Rückens injiziert worden war.

Die zweite Reihe (31—59) normale, nicht vorbehandelte Mäuse, Kontrollen.

Die dritte Reihe (60—75) Mäuse, mit 0,50 ccm defibriniertem Kaninchenblut unter die Haut des Rückens 11 Tage vor der Impfung injiziert.

Sämtliche Mäuse sind am 30. Mai 1908 mit 0,025 ccm Jensens Tumor in die rechte Axilla geimpft worden. Die erste Chartierung 10 Tage nach der Impfung.

1906)<sup>1)</sup>. Das Blut anderer Tierarten (Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Hund) zeigte nicht diese Schutzwirkung. Die weitere Analyse ergab, daß die Blutkörperchen die aktiven Elemente waren, während das Serum allein nicht wirksam war. Es zeigte sich keine Differenz zwischen Blutkörperchen oder Serum von normalen und resistenten Tieren. Das von normalen Mäusen gewonnene Vollblut entfaltet ebenso hohe Schutzwirkung gegen Nachimpfungen, wie das Blut von Tieren, die durch Spontanheilung von ihren Tumoren befreit worden waren<sup>2)</sup> im Gegensatz zu den von Clowes mitgeteilten höheren carcinomfeindlichen Eigenschaften des letzteren. Die durch Blutinjektion hervorgerufene Resistenzsteigerung ist in Fig. 29 für das Jense'sche Carcinoma demonstriert.

Diese grundlegenden Versuche für die durch normale Gewebe produzierte Immunität bezogen sich nur auf gewisse Dosen von Jense's Tumor. Durch größere Dosen konnte die Resistenz überwunden werden, und die Resultate dürfen nicht verallgemeinert werden. Andere Forscher haben diese Versuche wiederholt und sie für verschiedene andere Tumoren bestätigt, z. B. Lewin für sein Rattensarkom, Flexner und Jobling für ihren Rattentumor, während andere, z. B. Ehrlich, Schöne und Apolant nicht imstande waren, denselben Grad von Resistenz zu erhalten, und den Schluß gezogen haben, daß dies Verhältnis durch eine höhere Virulenz ihrer Tumoren bedingt sei. Wie schon hervorgehoben, war die Verallgemeinerung unserer Befunde nicht von uns gemacht worden. Andere unserer Tumoren zeigen dieses Verhältnis nicht ausgesprochen. Fig. 30 zeigt das Protokoll eines Versuches mit einem hämorrhagischen Mäusecarcinom (Tumor 50). Die durch Vorbehandlung mit Blut gegen diesen Tumor erhaltene Resistenzsteigerung bleibt, wie Gierke<sup>3)</sup> schon mitgeteilt hat, hinter der für den Jense'schen Tumor in Fig. 29 gezeigten weit zurück. Für andere Tumoren, bei denen wir die Blutimmunität probiert haben (ein Plattenepithelcarcinom [Tumor 32] und ein langsam wachsendes Mammaadenocarcinom [Tumor 27]), ist das Resultat fast negativ. Wir sehen also, sowohl nach unserer eigenen Erfahrung, als in den

1) Brit. med. Journ., July 28, 1906.

2) Die hämorrhagischen Mäusetumoren. Zieglers Beiträge, 1908.

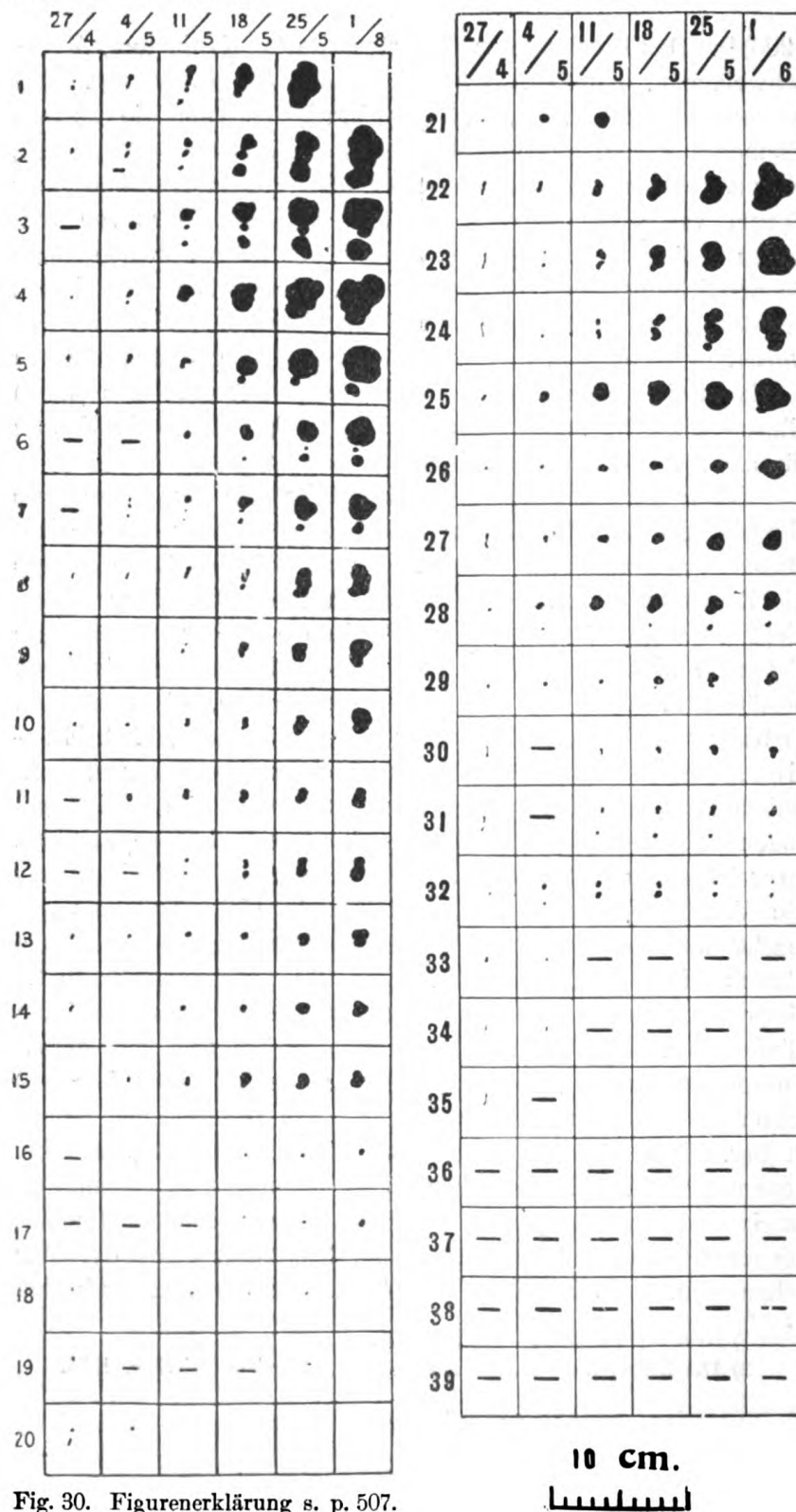


Fig. 30. Figurenerklärung s. p. 507.

von anderen Forschern erhaltenen widersprechenden Resultaten nur weitere Zeugnisse dafür, daß die Wachstumsbedingungen für verschiedene Geschwülste spezifisch sind und daß die für einen bestimmten Tumor ungünstigen Bedingungen nicht notwendigerweise gegen andere Geschwülste wirksam sein müssen.

Schöne<sup>1)</sup> zeigte, daß Resistenzsteigerung auf Injektion von Mäuseembryonen-Emulsion folgen konnte. Dies repräsentierte einen bedeutenden technischen Fortschritt, weil es relativ leicht ist, große Mengen steriler Mäuseembryonen zu erhalten, während in Blutversuchen immerhin eine gewisse Gefahr für Infektion des gesamten defibrinierten Blutes durch einzelne Fälle von Sepsis in den zahlreichen entbluteten Tieren und während der immer lange dauernden Herstellung vorhanden ist.

Schöne hat nicht die Größe der immunisierenden Injektion und der nachfolgenden Impfdosis näher angegeben. Wir haben mit unseren Tumoren Schönes Resultate bestätigen können, und haben in gleicher Weise, wie wir den Effekt der einzelnen Komponente des Blutes analysiert hatten, zeigen können, daß die verschiedenen Gewebe des Mausembryos (einzeln genommen) nicht eine gleichmäßige Schutzwirkung gegen unsere transplantierbaren Tumoren entfalten. Borrel und Bridré haben auch die immunisierende Wirkung der isolierten Mäusegewebe mit genauer Rücksicht auf Dosierung studiert. Sie haben erhöhte Resistenz mit Leber, Milz und Gehirn, aber nicht mit Testis erhalten.

Da wir außer zahlreichen Mammacarcinomen von wechselnder Histologie noch ein Plattenepithelcarcinom, ein Spindelzellensarkom und ein Osteochondrosarkom, alle transplantierbar, besaßen, und dazu noch übertragbares Sarkom und ein eben solches Carcinom der Ratte, haben wir unsere Versuche in instruktiver Weise variieren können. Von beinahe ausgetragenen

Fig. 30. Geringfügige Schutzwirkung gegen nachfolgende Impfung mit hämorrhagischem Mäusecarcinom (Tumor 50) nach vorgehender Behandlung mit defibriniertem Mäuseblut.

1—20, normale Mäuse, Kontrollen.	} Sämtliche Mäuse am 16. April 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von Tumor 50 in die rechte Axilla geimpft. Die erste Chartierung 11 Tage später. (Exp. 50/9 H.)
21—39, Mäuse, denen 0,30 ccm defibriniertes Mäuseblut unter die Haut des Rückens 16 Tage vor der Impfung injiziert worden waren.	

1) Münch. med. Wochenschr., Dez. 1906, No. 51.

Mäuseembryonen ist es leicht, die Haut in großen Fetzen abzuziehen, und wir sind dadurch imstande, auf der einen Seite die Haut allein, auf der anderen Seite den Rest der embryonalen Gewebe, für immunisatorische Zwecke getrennt zu verwenden. Weiter können wir durch Auspräparierung der Mammae<sup>1)</sup> aus graviden Weibchen Mamma beinahe rein erhalten.

Wenn wir die Resultate kurz zusammenfassen, ist die durch isolierte, normale Gewebe hervorgerufene Resistenz gegen verschiedene Tumoren nicht gleichmäßiger Art. Im allgemeinen kann gesagt werden, daß die Schutzwirkung eines normalen Gewebes desto größer ist, je näher verwandt es in histogenetischer Beziehung mit dem für die spätere Impfung gebrauchten Tumor ist. Die Schutzwirkung braucht nicht hinter der durch Tumorbrei hervorgerufenen zurückzubleiben und kann sogar eine absolute sein.

Die Fig. 31 illustriert die Resultate eines solchen Versuches. Die erste Reihe (1—20) sind normale Mäuse (Kontrollen), die Tiere der zweiten Reihe (21—33) sind mit enthäuteten Embryonen, diejenigen der dritten Reihe mit Embryohaut allein vorbehandelt worden. Alle sind 17 Tage nach der Vorbehandlung der zweiten

1) Bashford, Murray u. Haaland, Berl. klin. Wochenschr., Sept. 1907, No. 38—39.

	30/9	7/10	14/10	21/10	28/10
1	!	!	!		
2	!	!			
3	!	!	!		
4	!	!	!	!	
5	!	!	!	!	
6	!	!	!	!	
7	!	!	!		
8	!	!	!	!	!
9	!	!	!	!	—
10	!	!	!	—	—
11	!	!	—	—	—
12	!	!	—	—	—
13	!	—	—	—	—
14	!	!	—	—	—
15	!	!	—	—	—
16	!	!	—	—	—
17	!	!	—	—	—
18	!	!	—	—	—
19	!	—	—	—	—
20	—	—	—	—	—

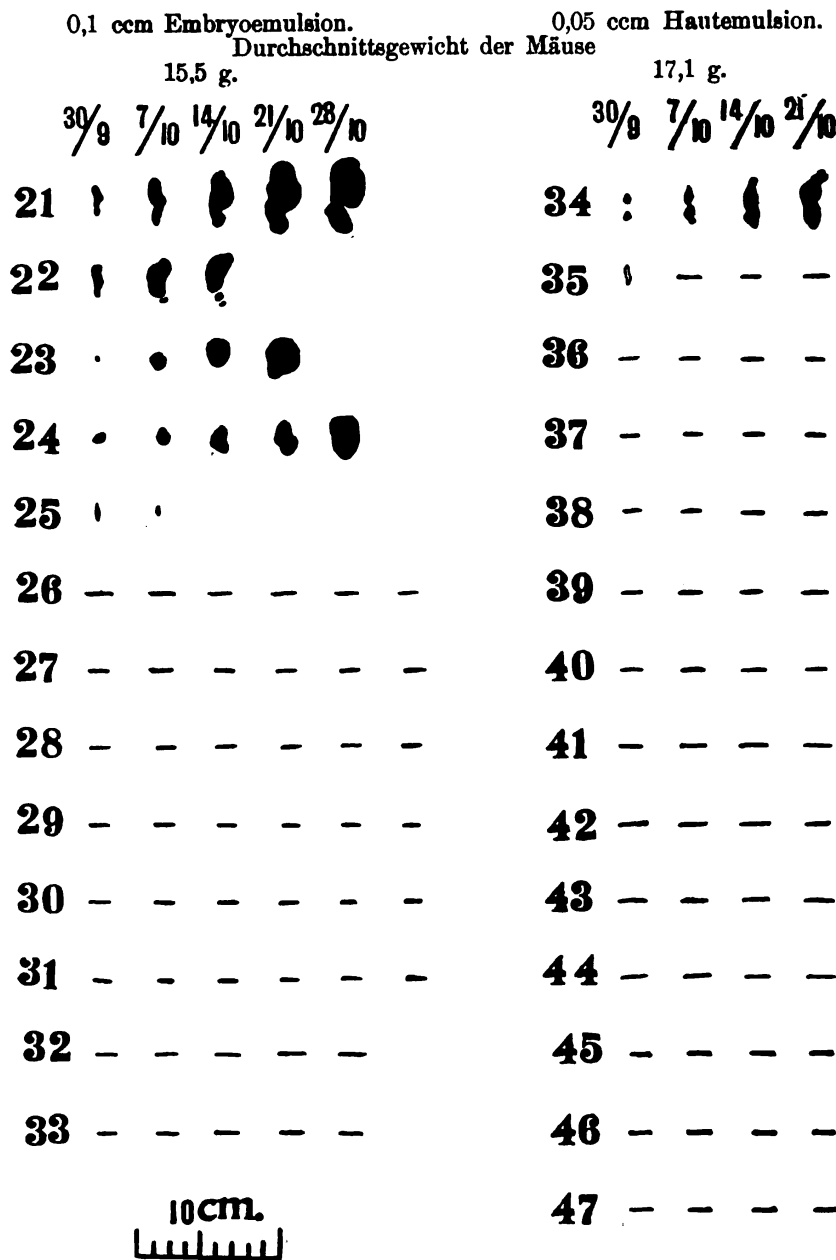


Fig. 31. Resistenz gegen Impfung mit Plattenepithelkrebs nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben.

1—20, normale Mäuse, Kontrollen.  
 21—33, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von enthäuteten Mäuseembryonen subkutan am Rücken 17 Tage vor der Impfung vorbehandelt.  
 34—47, Mäuse, mit 0,05 ccm Emulsion von Haut von Mäuseembryonen subkutan am Rücken 17 Tage vor der Impfung vorbehandelt.

Sämtliche Mäuse am 20. Sept. 1907 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs (Tumor 32) in die rechte Axilla geimpft. Erste Chartierung 10 Tage später. (Exp. 32/17 A.)

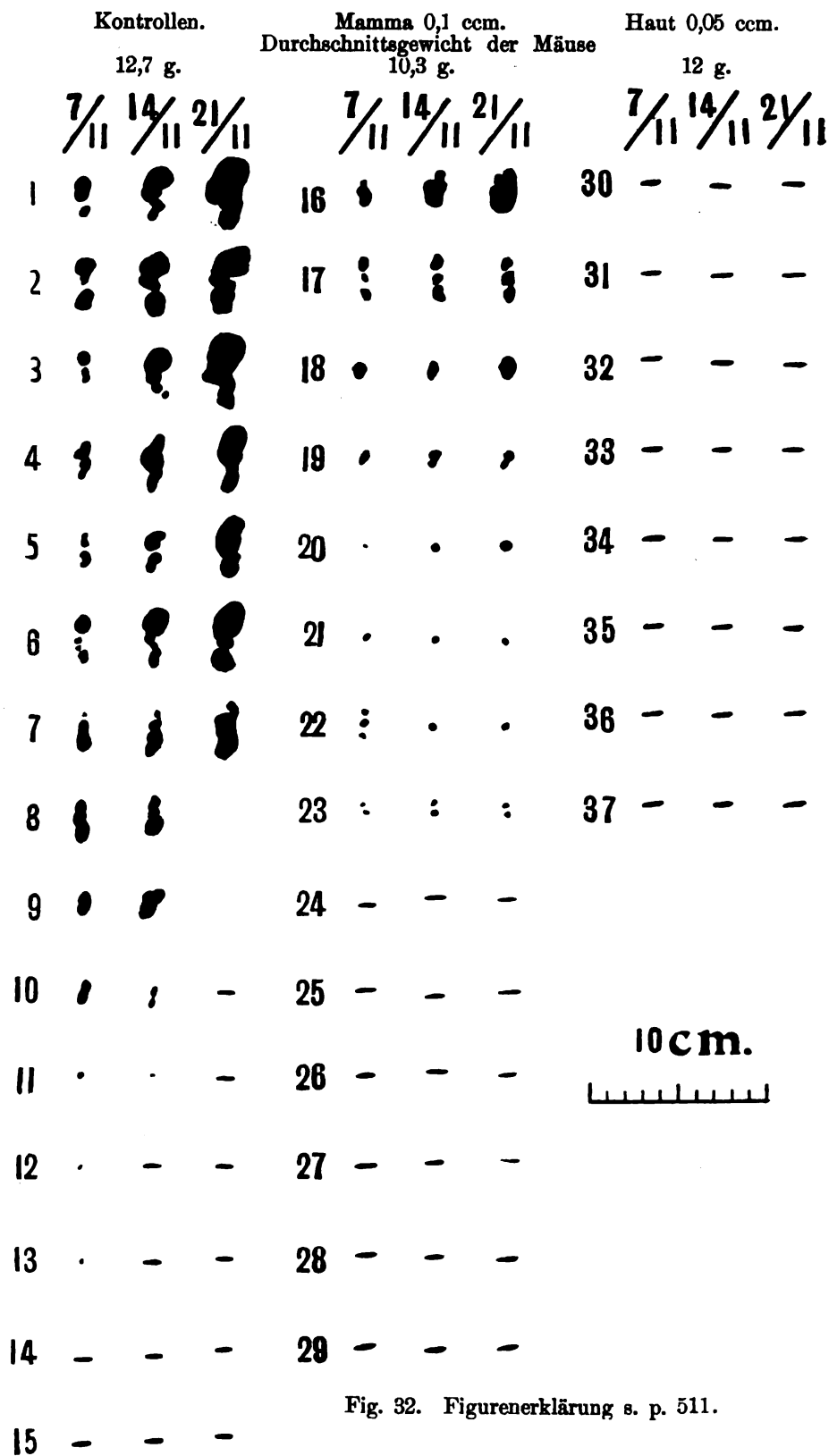


Fig. 32. Figurenerklärung s. p. 511.



und dritten Reihe mit Plattenepithelkrebs geprüft worden. Während die mit enthäuteten Embryonen vorbehandelten Mäuse in diesem Versuch nur in geringem Grade weniger empfänglich als normale Tiere erschienen, sind die mit Haut vorbehandelten Mäuse hochresistent. Dieser immunisatorische Effekt der Embryohaut ist für den Plattenepithelkrebs (Tumor 32) konstant, und ist in verschiedenen anderen Protokollen demonstriert worden (Fig. 32—36). Auf der anderen Seite vermag Mammaemulsion gegen das Wachstum des Plattenepithelcarcinoms nur geringfügigen Schutz auszuüben (siehe Fig. 32) und mag sogar, wie Fig. 33 zeigt, nach einem gewissen Zeitintervall, eine entgegengesetzte Wirkung haben, nämlich Hypersensibilität. Ein ähnliches Resultat ist gelegentlich nach Vorbehandlung mit hautfreien Embryonen zu beobachten (Fig. 34). Gegen Mammatumoren aber scheint der Schutzeffekt der Mamma größer zu sein. Dagegen ist der immunisatorische Effekt von Hautinjektion nicht auf das Plattenepithelcarcinom begrenzt, sondern Haut schützt auch im hohen Grade gegen Mammageschwülste.

#### 4. Artspezifität der Resistenz nach Resorption von normalen Geweben.

Genau auf dieselbe Weise, wie Injektion von Tumorgewebe fremder Tierarten gegen nachfolgende Impfung mit Mäusecarcinom oder -sarkom keinen deutlichen Schutz leistet, verhält sich auch normales Gewebe fremder Tierarten. Resistenz ist nur mit normalen Geweben derselben Tierart zu erhalten; Mäuse können nicht durch Vorbehandlung mit normalen Geweben von der Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen geschützt werden. Die Unterschiede, die durch das Ueberleben und Wachstum lebender Zellen als Indikator gemessen

Fig. 32. Resistenz gegen Impfung mit Plattenepithelkrebs nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben. Größere Schutzwirkung nach Vorbehandlung mit Haut als mit normaler Mamma, obwohl die doppelte Menge von Mamma injiziert worden war.

1—15, normale Mäuse, Kontrollen.

16—29, Mäuse, die mit 0,10 ccm Emulsion von Mäusemamma 20 Tage vor der Impfung unter die Rückenhaut injiziert worden waren.

30—37, Mäuse, mit 0,05 ccm Hautemulsion von Mäuseembryonen 20 Tage vor der Impfung subkutan auf dem Rücken inokuliert.

Sämtliche Mäuse am 28. Okt. 1907 mit 0,02 g von Plattenepithelkrebs (Tumor 32) in die rechte Axilla geimpft. Erste Chartierung 10 Tage später. (Exp. 32/14 F.)

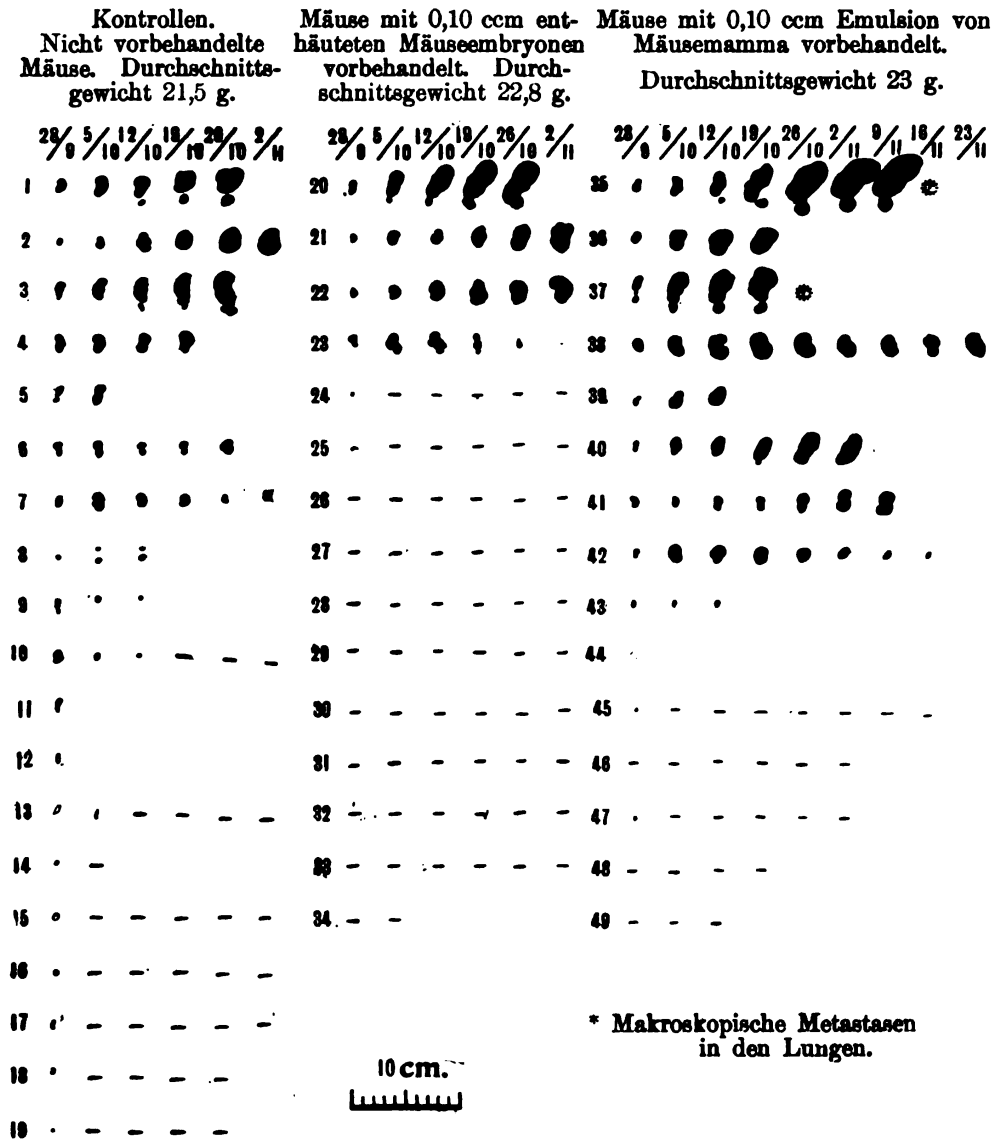


Fig. 33. Resistenz und Hypersensibilität gegen Impfung mit Plattenepithelkrebs nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben.

1—19, normale Mäuse, Kontrollen.

20—34, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von enthäuteten Mäuseembryonen 15 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

35—49, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von Mäusemamme 16 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

50—67, Mäuse, mit 0,05 ccm Emulsion von Mäuseembryohaut 15 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

Sämtliche Mäuse am 18. Sept. 1907 mit 0,02 g Plattenepithelkrebs in die rechte Axilla inokuliert. Erste Chartierung 10 Tage später. (Exp. 32/16 D.)

Mäuse mit 0,05 ccm Haut-  
emulsion von Mäuseembryonen  
vorbehandelt. Durchschnitts-  
gewicht 19 g.

	28/9	6/10	12/10	19/10	28/10	2/11	9/11	16/11
50	•	•	•	•	•	•	•	•
51	•	•	•	•	•	•	•	•
52	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-

werden können, sind so fein, daß z. B. der Unterschied zwischen der Haut von Mäuse- und Rattenembryonen klar zutage tritt durch komplette Verhinderung des Wachstums resp. gänzliche Abwesenheit jeder Schutzwirkung. Fig. 35 zeigt einen Versuch, in welchem die Empfänglichkeit von 6 Reihen von Mäusen, die mit verschiedenen einzelnen Mäuse- und Rattengewebe vorbehandelt worden sind, mit der Empfänglichkeit normaler Mäuse (die erste Reihe, 1—15) für gleichzeitige Impfung mit Plattenepithelkrebs und Mammakrebs verglichen worden sind. Die immunisierenden Einspritzungen waren 18 Tage vorher subkutan am Rücken gemacht. Der Tumor wurde gleichzeitig in beide Axillengegenden, und zwar der Plattenepithelkrebs rechts, der Mammakrebs links, injiziert. Der Gegensatz zwischen den mit Mäuse- resp. Rattenhaut injizierten Reihen (4. resp. 7. Reihe) ist sehr frappant. Der Einfluß der Mammainjektion ist in diesem Versuch nicht so klar. Das Wachstum des Mammakrebses

(schwarz) ist gewiß mehr als das des Plattenepithelkrebses (schraffiert) gehemmt worden; aber Rattenmamma scheint noch mehr wirksam; dieser letzte Effekt ist aber inkonstant und in diesem Versuch wahrscheinlich nur zufällig. Die mit Emulsion von enthäuteten Mäuseembryonen vorbehandelten Tiere waren nur wenig geschützt, während die entsprechende mit Rattenembryoemulsion inokulierte Reihe sogar statt erhöhter Resistenz an-

Kontrollen.  
Nicht vorbehandelte Mäuse.  
Durchschnittsgewicht 11,4 g.

	6/8	12/8	20/8	9/9	26/9
1	!	!	!	!	!
2	!	!	!	!	!
3	!	!	!	!	!
4	!	!	!	!	!
5	!	!	!	!	!
6	!	!	!	!	!
7	!	!	!	!	!
8	!	!	!	!	!
9	!	!	!	!	!
10	!	!	!	!	!
11	!	!	!	!	!
12	!	!	!	!	!
13	!	!	!	!	!
14	!	!	!	!	!
15	!	!	!	!	!
16	!	!	!	!	!
17	!	!	!	!	!
18	!	!	!	!	!
19	!	!	!	!	!
20	!	!	!	!	!
21	!	!	!	!	!

Mäuse mit 0,10 ccm Emulsion  
enthäutete Mäuseembryonen vor-  
behandelt.

Durchschnittsgewicht 11,1 g.

	6/8	12/8	20/8	9/9	26/9
22	!	!	!	!	!
23	!	!	!	!	!
24	!	!	!	!	!
25	!	!	!	!	!
26	!	!	!	!	!
27	!	!	!	!	!
28	!	!	!	!	!
29	!	!	!	!	!
30	!	!	!	!	!

Mäuse mit 0,10 ccm  
Hautemulsion von  
Mäuseembryonen vor-  
behandelt. Durch-  
schnittsgewicht 12,1 g.

	6/8	12/8	20/8	9/9	26/9
31	!	!	!	!	!
32	!	!	!	!	!
33	!	!	!	!	!
34	!	!	!	!	!
35	!	!	!	!	!
36	!	!	!	!	!
37	!	!	!	!	!
38	!	!	!	!	!
39	!	!	!	!	!

\* Makroskopische Metastasen in den Lungen.

10Cm.

Fig. 34. Resistenz und Hypersensibilität gegen Impfung mit Plattenepithelkrebs nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben.

1—21, normale Mäuse, Kontrollen.  
22—30, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von enthäuteten Mäuseembryonen 30 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

31—39, Mäuse, mit 0,10 ccm Hautemulsion von Mäuseembryonen 30 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

Sämtliche Mäuse am 27. Juli 1907 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs in die rechte Axilla geimpft. Erste Chartierung 10 Tage später. (Exp. 32/13 F.)

scheinend Hypersensibilität aufwies. Diese Beobachtung, daß die Injektion normaler Gewebe nicht immer ungünstige Wachstumsbedingungen für Tumoren zur Folge zu haben braucht, sondern gelegentlich auch solche, die das Wachstum fördern, ist von großer Bedeutung. Fig. 33 und 34 illustrieren dies Verhältnis für den Plattenepithelkrebs nach Vorbehandlung mit Mäusemamma und enthäuteten Mäuseembryonen. Fig. 36 zeigt eine ähnliche Versuchsserie mit demselben Plattenepithelkrebs (rechts) und einem Spindelzellensarkom (links). Ein relativ spärliches Wachstum fand sowohl in den normalen Mäusen der Kontrolle statt, als auch in allen mit Mäuse- und Rattengeweben vorbehandelten Tieren, mit der Ausnahme von den Mäusen 40—46, die 6 Wochen vorher mit Rattenmamma injiziert worden waren. Die auch mit Rattenmamma, aber nur 16 Tage vor der Tumorinjektion, vorbehandelten Mäuse 47—50 in der angrenzenden Reihe zeigen dieses Phänomen nicht. Das zwischen beiden Injektionen angewandte Zeitintervall scheint diesem Versuch nach bedeutungsvoll für die Entscheidung, ob Resistenzsteigerung oder Hypersensibilität folgen wird. Hypersensibilität scheint ein weniger spezifisches Phänomen als Resistenzsteigerung zu sein. Sie scheint durch sehr verschiedene Substanzen verursacht zu werden und sowohl bei Einführung von Geweben aus fremden Tierarten als von Geweben derselben Art. Flexner und Jobling<sup>1)</sup> haben konstant Hypersensibilität für ihre Rattengeschwülste durch Vorbehandlung mit erhitztem Tumormaterial hervorrufen können.

Dieses Phänomen gibt interessante Fingerzeige zur Herbeiführung konstitutioneller, das Wachstum eines Tumors befördernder Bedingungen und dadurch möglicherweise die Verbreitung begünstigender Faktoren (cf. Mäuse 22, 24 und 29 in Fig. 34).

Aus den Resultaten der Kreuzversuche mit den Normal- und krebsigen Geweben derselben und fremder Tierarten haben wir die Schlußfolgerungen gezogen: 1) daß die krebsigen Gewebe einer Tierart ihre Arteigenschaften beibehalten, und 2) daß innerhalb einer Species die verschiedenen Geschwülste die biochemischen Eigenschaften ihres Muttergewebes nicht wesentlich verändern. Das Aufstellen des Begriffes der Pan-

1) Proc. Soc. for exp. Biology and Med. New York, June 22, 1907.

Kontrollen.  
Normale Mäuse.  
Durchschnittsgewicht 11,8 g.

Enthäutete Mäuseembryonen  
0,10 cm am Rücken.  
Durchschnittsgewicht 13 g.

Mäusemamma 0,10 cm am  
Rücken.  
Durchschnittsgewicht 12,8 g.

	4/11	11/11	18/11
	r	l	r
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

	4/11	11/11	18/11
	r	l	r
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			

	4/11	11/11	18/11
	r	l	r
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			

Fig. 35.  
Figurenerklärung s. p. 517.

Mäuseembryohaut 0,05 ccm  
am Rücken.  
Durchschnittsgewicht 10,5 g.

	4/11	11/11	18/11
	r	r	r
38	·	·	·
39	'	-	-
40	'	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	-	-

Fig. 35. Resistenz gegen gleichzeitige Impfung mit Plattenepithel- und Mammakrebs nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben, aber nicht nach Vorbehandlung mit normalen Rattengeweben.

1—15, normale Mäuse, Kontrollen.

16—47, mit normalen Mäusegeweben vorbehandelte Mäuse.

16—23, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von enthäuteten Mäuseembryonen 15 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

24—37, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von Mäusemamma 15 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken vorbehandelt.

38—47, Mäuse, mit 0,05 ccm Hautemulsion von Mäuseembryonen 15 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken vorbehandelt.

48—75, mit normalen Rattengeweben vorbehandelte Mäuse.

48—57, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von enthäuteten Rattenembryonen 16 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

58—65, Mäuse, mit 0,10 ccm Emulsion von Rattenmamma 16 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken vorbehandelt.

66—75, Mäuse, mit 0,10 ccm Hautemulsion von Rattenembryonen 16 Tage vor der Impfung subkutan am Rücken injiziert.

Sämtliche Mäuse am 24. Okt. 1907 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs (Tumor 32) in die rechte Axilla und gleichzeitig mit 0,025 ccm Emulsion von Mammakrebs (Tumor 46) in die linke Axilla geimpft. Im Protokoll sind die sich entwickelnden Plattenepithelkrebs in der rechten Axilla (r.) schraffiert, und die Mammakrebse in der linken Axilla (l.) vollschwarz dargestellt. Erste Chartierung 11 Tage nach der Impfung. (Exp. 32/18 E; 46/10 D.)

Fortsetzung siehe p. 518.

immunität ließe wohl die Möglichkeit eines gemeinsamen Virus für verschiedene Geschwülste derselben Tierart zu, und selbst für Geschwülste

verschiedener Tierarten, wenn man die Versuche Schönes und Lewins, die Resistenz durch Vorimpfung mit Krebs artfremder Tiere erzeugt haben wollen, gelten ließe. Dagegen schließen unsere Versuchsanordnungen mit Berücksichtigung quantitativer Verhältnisse diese Möglichkeit vollständig aus.

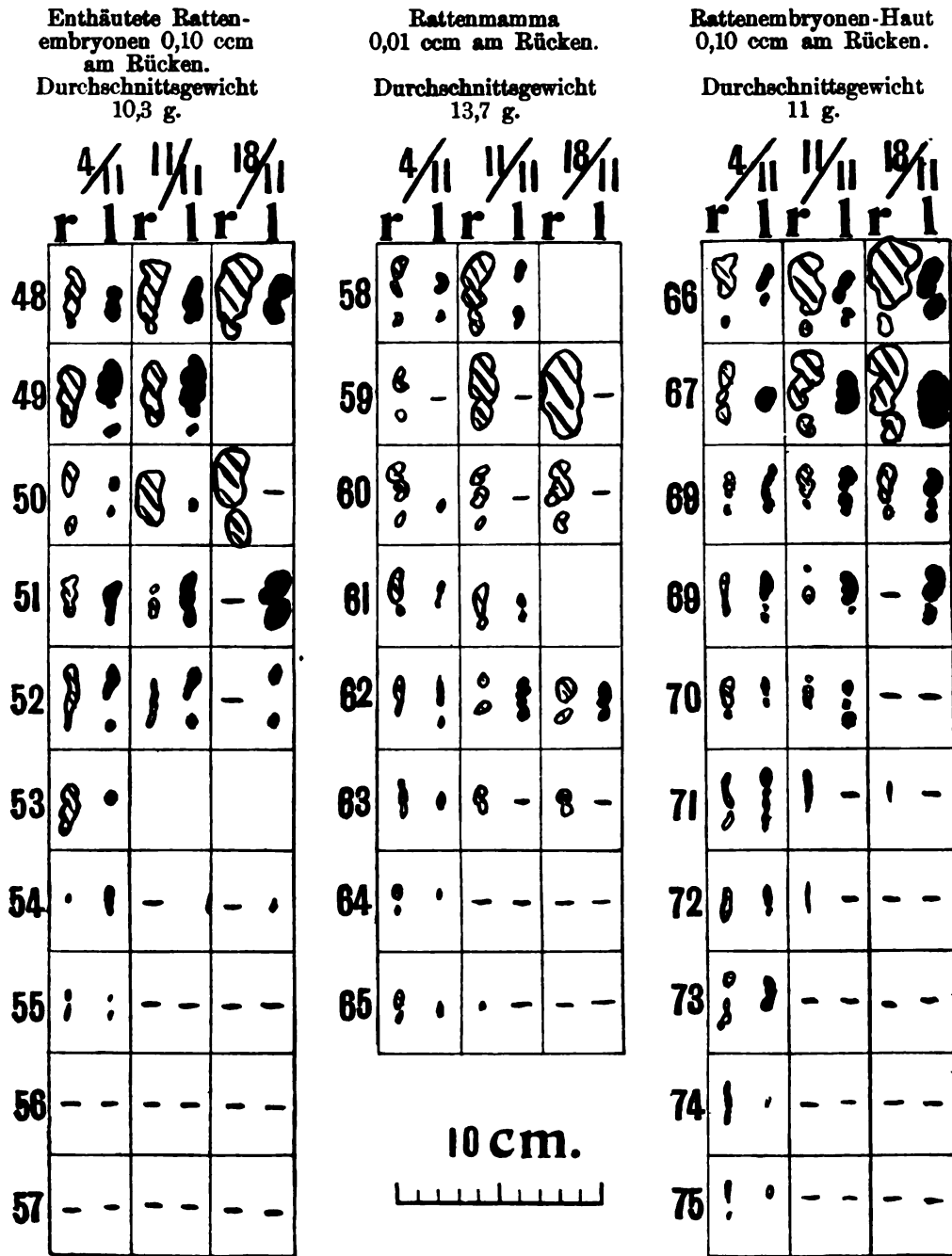


Fig. 35. Figurenerklärung siehe p. 517.



### 5. Reinokulation positiver Tiere.

Die Frage drängt sich natürlich auf, welchen Effekt ein Tumor auf das Tier ausübt. Schützt eine gelungene Inokulation gegen eine zweite Impfung? Oder ändert das Vorhandensein eines Tumors das Tier in entgegengesetzter Richtung und begünstigt es die Metastasenbildung?

Im Jahre 1904 haben wir angegeben, daß Mäuse mit wachsenden Tumoren mit positivem Resultat reinokuliert werden können. Mit Rücksicht auf das Vorkommen von Metastasen im menschlichen Krebs scheinen uns diese der artifizuellen Reproduktion von Metastasen ähnlichen positiven Resultate von Bedeutung. Ehrlich gab im Jahre 1905 an, daß Mäuse mit schnell wachsenden Tumoren nicht reinokuliert werden können, und er erklärte dies durch die Annahme, daß der erste Tumor die Nährstoffe für sich beansprucht, so daß die zweite Inokulation nicht genügend ernährt werden kann. Auf dieser Beobachtung hat, wie bekannt, Ehrlich die Hypothese der athreptischen Immunität aufgebaut, für welche er in dem Verhalten der Metastasen in transplantierten Tumoren eine weitere Stütze zu finden glaubte.

Die Bildung von Metastasen kommt in den verschiedenen Tumorstämmen mit wechselnder Häufigkeit vor. Während in einem der sehr langsam wachsenden Tumoren (Tumor 27) trotz durch mehr als 2 Jahre darauf gerichteter Aufmerksamkeit noch keine makroskopischen Metastasen gefunden worden sind, zeigen unsere schnell wachsenden Geschwülste, z. B. der Plattenepithelkrebs, das Spindelzellensarkom und das Jensensche Carcinom, die wir für unsere Immunitätsversuche bevorzugt haben, solche sehr häufig. In diesen Tumorstämmen hängt die Häufigkeit der Metastasen und ihre Größe hauptsächlich von der Lebensdauer des tumortragenden Tieres ab, und abgesehen von diesem Faktor ist kein konstantes Verhältnis zu der Schnelligkeit des Wachstums nachzuweisen. Die von den Metastasen erreichte Größe ist von denselben Bedingungen abhängig wie die der transplantierten Tumoren; insbesondere ist hierfür die Anfangsdosis von hoher Bedeutung. Es ist selbstverständlich, daß der arterielle Embolus in den Lungengefäßen, von dem eine Metastase ihren Ursprung nimmt, viel kleiner ist als irgend eine für Transplantation gebrauchte



Mit Rattenmammas vor-  
behandelte Mäuse. 0,05 ccm  
am Rücken. 9. Nov. 1907.

Durchschnittsgewicht 16,9 g.

	5	12	19	26	2
	12	12	12	12	1
	R	L	R	L	R
47	•	!	•	!	•
48	•	!	•	!	•
49	•	!	•	!	•
50	•	•	•	•	•

Mit Haut von Ratten-  
embryonen vorbehandelte  
Mäuse. 0,05 ccm am Rücken.  
9. Nov. 1907.

Durchschnittsgewicht 15 g.

	5	12	19	26	2
	12	12	12	12	1
	R	L	R	L	R
66	•	!	•	!	•
67	•	!	•	!	•
68	•	!	•	!	•
69	•	!	•	!	•
70	•	!	•	!	•
71	•	!	•	!	•
72	•	!	•	!	•

Mit Haut von Ratten-  
embryonen vorbehandelte  
Mäuse. 0,1 ccm am Rücken.  
8. Okt. 1907.

Durchschnittsgewicht 17,33 g.

	5	12	19	26	2
	12	12	12	12	1
	R	L	R	L	R
51	•	!	•	!	•
52	•	!	•	!	•
53	•	!	•	!	•
54	•	!	•	!	•
55	•	!	•	!	•
56	•	!	•	!	•
57	•	!	•	!	•
58	•	!	•	!	•
59	•	!	•	!	•
60	•	!	•	!	•
61	•	!	•	!	•
62	•	!	•	!	•
63	•	!	•	!	•
64	•	!	•	!	•
65	•	!	•	!	•

Fig. 36. Ähnlicher Versuch wie derjenige in Fig. 35; zeigt Resistenz gegen Plattenepithelkrebs und Spindelzellensarkom nach Vorbehandlung mit normalen Mäusegeweben und das Fehlen jeder Resistenz nach Vorbehandlung mit Rattengewebe. In einigen Fällen (z. B. mit Mamma) scheinen die Rattengewebe sogar Hypersensibilität hervorzurufen. Sämtliche Mäuse am 25. Nov. 1907 mit 0,01 g Plattenepithelkrebs (schraffiert) in der rechten Axilla (r.) und gleichzeitig mit 0,01 g Spindelzellensarkom (vollscharz) in der linken Axilla geimpft. (Exp. 32/18 F; 37/15 G.)

Die detaillierte Beschreibung der Vorbehandlung ist über jeder Reihe angegeben.

Dosis. Hieraus läßt sich folgern, daß, wenn der transplantierte Tumor von einer großen Geschwulstgabe ausgeht und schnell wächst, der Tod des Tieres eintritt, bevor die Metastasen makroskopische Größe erreicht haben. Das Hindernis für das Wachstum, das die Wände der Lungenarterien darbieten, und die anfängliche Schwierigkeit der Vaskularisation — von irgendwelchem Einfluß des ersten Tumors auf die Konstitution abgesehen — mögen auch die Dauer des Wachstums der Emboli verlängern.

Wir wenden uns jetzt zu der artifiziiellen Nachahmung der Metastasenbildung durch Reinokulation von Tumoren tragenden Mäusen die wir der Kürze halber „positive“ Mäuse nennen werden. Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht der Resultate homologer Reinokulationen für ein hämorrhagisches Carcinom (Tumor 50), ein Adenocarcinom der Mamma (Tumor 27), das Jensensche Mäusecarcinom, den Plattenepithelkrebs (Tumor 32), Tworts Carcinom und Jensens Rattensarkom. Diese 6 Tumoren sind als Paradigmata verschiedenartiger, sowohl rasch als langsam wachsender Tumoren gewählt worden, und ihre durchschnittliche Angangsziffer in normalen Tieren variiert zwischen 27 und 91 Proz.

Allgemeine Resultate von Reinokulation „positiver“ Mäuse und Ratten.

		Anzahl inoku- lierter Tiere	Anzahl erfolg- reicher Impf- ungen	Impf- ausbeute in Prozenten
Hämorrhagisches Mäusecarcinom (Tumor 50)	Reinokulation	38	25	66
	„positiver“ Tiere Kontrollen	82	22	27
Adenocarcinom der Mamma von Maus (Tumor 27)	Reinokulation	39	23	59
	„positiver“ Tiere Kontrollen	64	28	44
Jensensches Mäuse- carcinom	Reinokulation	68	26	39
	„positiver“ Tiere Kontrollen	111	55	50
Plattenepithelkrebs der Maus (Tumor 32)	Reinokulation	41	23	56
	„positiver“ Tiere Kontrollen	113	64	56
Carcinoma solidum d. Mamma v. Maus (Tworts Tumor)	Reinokulation	39	26	66
	„positiver“ Tiere Kontrollen	38	26	66
Jensens Ratten- sarkom	Reinokulation	50	25	50
	„positiver“ Tiere Kontrollen	83	76	91

Es geht aus der Tabelle hervor, daß von den Zahlen einige unsere Angaben von 1904 sowie die von Gierke bestätigen, andere das von Ehrlich beschriebene Phänomen illustrieren. Die Frage ist nur, ob wir den negativen oder den positiven Resultaten die größte Bedeutung zuschreiben sollten, oder ob es möglich ist, die anscheinenden Widersprüche in Einklang zu bringen.

Die Zahlen zeigen, daß die Resultate der Reinokulation nicht jene sind, die wir, der Annahme nach, daß positive Tiere nur unveränderte, empfängliche, durch die Tumorimpfung ausgewählte Individuen sind, erwarten würden. Wenn dies der Fall wäre, müßte die zweite Inokulation in „positiven“ Mäusen in einer viel höheren Prozentzahl als in den Kontrollen angehen. Dies ist auch der Fall mit Tumor 27 und 50, für welche die zweite Impfung positiver Tiere in 59 resp. 66 Proz. angeht, während die Kontrolle 44 resp. 27 Proz. zeigt. Für den Plattenepithelkrebs (Tumor 32) und Tworts Carcinom geben die Reinokulationen und die Kontrollen dasselbe Resultat, nämlich 56 resp. 66 Proz. In dem Jensenschen Mäusecarcinom und Rattensarkom ist die Reinokulation weniger erfolgreich als die erste Impfung, nämlich 39 resp. 50 Proz., während die Kontrolle 50 resp. 91 Proz. positive Resultate aufweist.

Wir haben also in diesen Reihen von Versuchen auf der einen Seite die von zwei von uns in dem „First Scientific Report“ 1904 und später von Hertwig, Gierke und Borrel beschriebenen Phänomene, und auf der anderen Seite bei den zwei zuletzt erwähnten Geschwülsten das von Ehrlich 1905 als „athreptische Immunität“ beschriebene Phänomen.

Da die erstgenannten Tumoren (Tumor 27 und 50) ziemlich langsam wachsende Geschwülste sind, während Jensens Maus- und Rattentumor und der Plattenepithelkrebs (Tumor 32) ein rapides Wachstum zeigen, scheinen diese Zahlen die Richtigkeit der Ehrlichschen Beobachtungen in bezug auf schnell wachsende Tumoren zu bestätigen. Die Tatsache, daß selbst in Serien mit den am schnellsten wachsenden Geschwülsten eine zweite Impfung erfolgreich verlaufen kann, zeigt jedoch, daß das negative Resultat der Reinokulation kaum durch die Wachstumsschnelligkeit des ersten Tumors bedingt sein kann,

	$\frac{4}{3}$		$\frac{12}{3}$		$\frac{19}{3}$		$\frac{26}{3}$		$\frac{2}{4}$		$\frac{9}{4}$	
	r	l	r	l	r	l	r	l	r	l	r	l
1	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
2	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
3	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
4	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
5	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
6	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
7	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
8	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
9	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
10	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
11	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1
12	8		8	1	8	1	8	1	8	1	8	1

10 cm.



Fig. 37. Reinokulation von „Klein-Dosis-Positiven“ von Plattenepithelkrebs mit kleinen und großen Dosen desselben Tumors.

1—12, Mäuse, am 22. Febr. 1908 mit 0,02 g von Plattenepithelkrebs in die rechte Axilla inokuliert. (Exp. 32/13 J.)  
 13—28, normale Mäuse, als Kontrollen für die Reinokulation; geimpft am 5. März 1908 mit Emulsion desselben Tumors in die linke Axilla. (Exp. 32/24 D.)

Reinokuliert am 5. März 1908 mit Emulsion desselben Plattenepithelkrebses in die linke Axilla. 1—6 Dosis 0,025 ccm, 7—12 Dosis 0,15 ccm.  
 13—22 Dosis 0,025 ccm, Kontrollen für die erste Hälfte des Exp. (1—6). 23—28, Dosis 0,15 ccm, Kontrollen der zweiten Hälfte.

	$\frac{12}{3}$		$\frac{19}{3}$		$\frac{26}{3}$		$\frac{2}{4}$		$\frac{9}{4}$	
	r	l	r	l	r	l	r	l	r	l
13		!		!						
14		.		!		!		!		!
15		!		!		!				
16		!		!		.		!		!
17		!		!		!		!		!
18		!		!		.		—		—
19		.		!						
20		.		!		.		—		—
21		.		.		.				
22		.		.		—		—		—
23		!		!		!		!		!
24		!		!		!		!		!
25		!								
26		!		!						
27		!		!						
28		!		!		!		.		

und macht eine nähere Analyse der Bedingungen, unter welchen eine zweite Impfung in verschiedenen Tumorstämmen positiv oder negativ verläuft, notwendig. Für diesen Zweck sind in Prozenten angegebene Durchschnittsergebnisse nicht ausreichend.

Eine graphische Darstellung des Wachstums jedes einzelnen Tumors von Versuchen, in welchen die Tumorgaben der ersten und zweiten Impfung erheblich verschieden sind, und in welchen die zweite Impfung nicht mehr oder sogar noch weniger, erfolgreich als in den Kontrollen ist, eignet sich dazu, die anscheinenden Widersprüche aufzuklären.

Die histologische Untersuchung der Impfstelle lehrt, daß, wenn nicht die Impfdosis sehr klein ist, nach der Inokulation

Exp. 32/23. Erste Impfung mit kleinen Dosen 0,025 ccm.  
Durchschnittsgewicht bei der Reinokulation 16,0 g.

	$\frac{10}{3}$	$\frac{10}{3}$	$\frac{20}{3}$	$\frac{20}{3}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{H}{4}$
	r l	r l	r l	r l	r l	r l
1	!	!	!!	!!	!!	
2	!	!	!!	!!	!!	!!
3	!	!	!!	!!	!!	
4	!	!	!!	!!	!!	!!
5	!	!	!!	!!	!!	!!
6	!	!	!!	!!		
7	!	!	!!	!!	!	!
8	!	!	!!	!!	!	!
9	!	!	!	!	!	!
10	!	!	!	!	!	!
11	!	!	!	!	!	!
12	!	!	!	!	!	!
13	!	!	!	!	!	!
14	!	!	!	!	!	!

Fig. 38. Figurenerklärung siehe p. 527.

immer etwas Resorption von Tumorgewebe stattfinden muß. Jensen hat auch 1903 diese Tatsache berücksichtigt. Wie oben hervorgehoben (p. 397 u. ff.), kann, wenn die resorbierte Menge erheblich ist, die Empfänglichkeit des Tieres für eine



Erste Impfung mit großen Dosen  
0,15 ccm.  
Durchschnittsgewicht bei der Reinokulation 14,6 g.

Normale Mäuse. Kontrollen für  
die Reinokulation. (Exp. 32/26 B.)  
Durchschnittsgewicht 11,6 g.

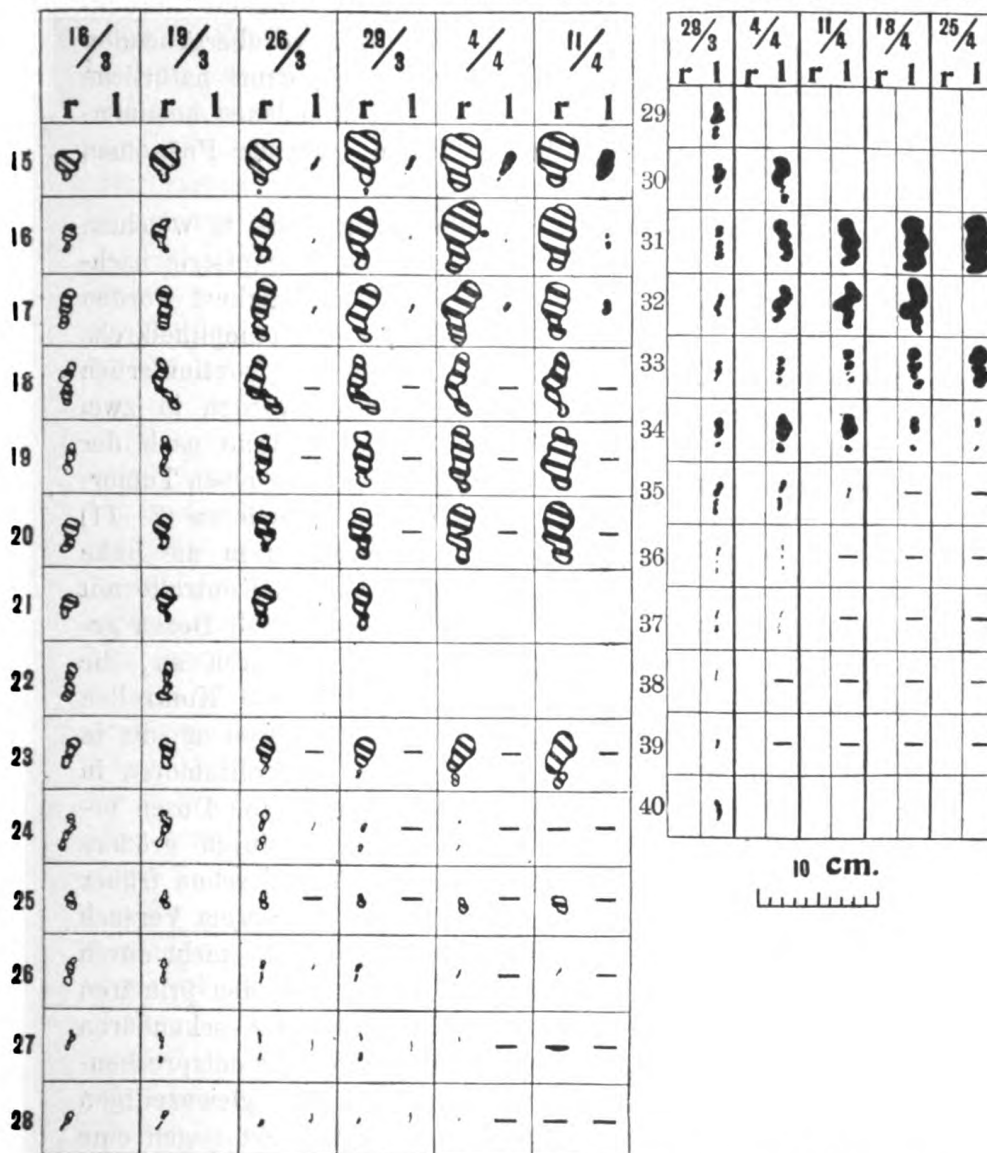


Fig. 38. Resultat der Reinokulation von „Klein-“ und „Groß-Dosis-Positiven“ von Plattenepithelkrebs (Tumor 32) mit kleinen Dosen desselben Tumors.

Mäuse 1—14 und 15—28 am 5. März 1908 mit 0,025 resp. 0,15 ccm Plattenepithelkrebs inokuliert. (Exp. 32/23 E.)

29—40 sind normale Mäuse, Kontrollen.

Sämtliche Mäuse sind am 19. März 1908 (d. h. 14 Tage später) mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs in die linke Axilla inokuliert worden. (Exp. 32/26 B.)

spätere zweite Impfung herabgesetzt und sogar das Wachstum des von der ersten Impfung sich entwickelnden Tumors beeinflusst werden. Auf diese Weise erklären wir die Zurückbildung kleiner Geschwülste nach einem vorübergehenden Wachstum. Wie dort betont worden ist, kann natürliche Resistenz in dem Sinne eines natürlich vorhandenen hemmenden Mechanismus kaum das in Frage stehende Phänomen erklären.

Fig. 37 zeigt das Protokoll eines Versuches, in welchem die Tiere einer mit kleinen Dosen angelegten Impfsérie nachträglich mit kleinen und großen Dosen reinokuliert worden sind. Die erste Impfung (0,025 ccm von Plattenepithelkrebs [Tumor 32] in die rechte Axilla) ergab 9 kontinuierlich wachsende Tumoren. Diese 9 „Positiven“ wurden in zwei Gruppen verteilt. Den 4 ersten wurde 12 Tage nach der ersten Inokulation dieselbe Dosis (0,025 ccm) desselben Tumorstammes in die linke Axilla injiziert. Die 5 anderen (7—11) bekamen die 6-fache Dosis (0,15 ccm) ebenfalls in die linke Axilla, gleichzeitig wurden normale Mäuse als Kontrolle mit denselben kleinen (13—22) und großen (23—28) Dosen geimpft. In der ersten Gruppe gingen 3 Tumoren an, die jedoch etwas langsamer als die entsprechenden Kontrollen wuchsen, in der zweiten Gruppe gingen 4 Tumoren an, die in keiner Weise hinter den entsprechenden Kontrolltumoren in ihrem Wachstum zurückblieben. Die gegen kleine Dosen bestehende Wachstumshemmung scheint somit durch größere Dosen überwunden werden zu können, wie wir schon früher für die Blutimmunität gezeigt haben. Die in diesem Versuch erscheinende Wachstumshemmung kann jedenfalls nicht durch Erschöpfung der vorhandenen Nährstoffe durch den primären Tumor erklärt werden, und das Wachstum der sekundären Tumoren der zweiten Gruppe, das demjenigen der entsprechenden Kontrolltumoren gleichkommt, trotz des gleichzeitigen Wachstums des primären Tumors, spricht direkt gegen eine solche Erschöpfung.

Andere Versuche, in welchen die erste Impfung in zwei Gruppen mit großen und kleinen Dosen, die zweite Inokulation nur mit kleinen Dosen gemacht worden ist, sind auch sehr wohl geeignet, auf diese Phänomene Licht zu

werfen. Fig. 38 zeigt die Anordnung und das Resultat eines solchen Versuches. In der ersten Reihe, in welcher die erste Impfung mit kleinen Dosen gemacht worden ist, entwickeln sich in 9 „Positiven“ („Klein-Dosis-Positiven“) 5 Tumoren, in der zweiten Reihe, in welcher die erste Impfung mit der 6-fachen Dosis stattgefunden hat, sind in 9 Positiven („Groß-Dosis-Positiven“) 3 Tumoren, deren Wachstum hinter denen der ersten Reihe erheblich zurückbleibt. Die Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der primären Tumoren sind in beiden Reihen im wesentlichen dieselben; der Unterschied zwischen den beiden Reihen besteht nur in der primären Impfdosis. Jede Reihe in sich illustriert die Phänomene, auf welche Ehrlich und wir verschiedenen Wert gelegt haben, resp. den negativen und den positiven Ausfall der Wiederimpfungen. Es kann nicht bezweifelt werden, daß in der zweiten Reihe mehr Tumorbrei zur Resorption gekommen ist, als in der ersten Reihe, und es ist durchaus natürlich, hierin die Erklärung der Unterschiede in der Resistenz beider Reihen zu erblicken. Auf dieselbe Weise dürfen vielleicht die Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen derselben Reihe erklärt werden. Die größten Tumoren der sekundären Impfung entwickeln sich überall in den Mäusen mit den größten primären Tumoren, wie es auch in einigen von Ehrlich nach Abschluß dieser Arbeit veröffentlichten Versuchsprotokollen<sup>1)</sup> der Fall ist. Umgekehrt zeigen die langsamer wachsenden Tumoren tragenden Tiere einen größeren Resistenzgrad. Da die Anfangsdosis für jede Maus derselben Reihe dieselbe war, läßt sich denken, daß in den die kleinen Tumoren tragenden Tieren eine größere Menge von Geschwulstmaterial resorbiert worden ist, als in jenen mit großen Tumoren.

Eine simultane Immunisierung durch Resorption von Geschwulstmaterial bei der ersten Impfung ist die natürlichste Erklärung dieser Phänomene, während die athreptische Erklärung für unsere Beobachtungen gar nicht zutrifft.

Versuche mit Jensens Rattensarkom zeigen diese Phänomene mit klagarmatischer Klarheit. Fig. 39 zeigt das

1) Die Genese des Carcinoms. Verh. d. deutsch. path. Gesellsch. Kiel 1908.

Resultat bei Tieren, welche von großen resp. kleinen Dosen entwickelte Tumoren tragen, und die wiederum mit großen und kleinen Dosen reinokuliert wurden. Von 5 Ratten, die mit kleinen Dosen vorgeimpft waren („Klein-Dosis-Positive“, zweite Gruppe, 7—11) entwickelten 4 nach Reinokulation mit großen Dosen gut wachsende Tumoren. Die einzige Ratte, in welcher die zweite Impfung negativ verlief, war die, in welcher der erste Tumor schlecht wuchs und schließlich resorbiert wurde. In 6 von denselben „Klein-Dosis-Positiven“ (dritte Gruppe 12—17), in welchen die Nachimpfung mit kleinen Dosen stattfand, entwickelten sich nur zwei Tumoren. Hier wieder kann die vorhandene Resistenz durch große Dosen überwunden werden, und ist die zweite Impfung nur in den die größten Tumoren tragenden Ratten erfolgreich. Simultane Immunisierung durch die erste Impfung ist die am nächsten liegende Erklärung, während natürliche Resistenz ebenso wenig wie Athrepsie ausreicht. Die erste Gruppe des Versuches (1—6) zeigt das Resultat von Reinokulation von 6 „Groß-Dosis-Positiven“ mit großen Dosen. Hier wiederum ist die einzige Ratte, in welcher der Tumor nicht wächst, diejenige, in welcher der erste Tumor schlecht wuchs. Eine natürliche Resistenz von Anfang an scheint nicht in Frage zu kommen, da der erste Tumor durch 5 Wochen kontinuierlich, obwohl langsam, gewachsen war. Die anderen Ratten trugen so große Tumoren, daß sie alle innerhalb 3 Wochen nach der zweiten Impfung starben, und dadurch das schließliche Resultat der zweiten Impfung unentschieden blieb.

Wenn Tumoren eine solche Größe erreicht haben, daß die Grenze der Assimilationsfähigkeit und des Gaswechsels des Tieres, wie Cramers Versuche zeigen, erreicht ist, ist die zweite Impfung entweder negativ oder ergibt kleine stationäre Tumoren. Dies Resultat ist gleichwertig mit dem in kranken oder kachektischen Mäusen erhaltenen. Für diese Fälle mag wohl der Ausdruck „Athrepsie“ für zutreffend gelten, aber in den Experimenten, wo durch exakt abgestufte Dosierung das frühzeitige Erschöpfen der Tiere vermieden wurde, treten in dem negativen Verlauf der zweiten Impfungen andere Phänomene zutage, die nur von anderen Betrachtungen aus zu erklären sind.

Durchschnittsgewicht bei der Reinokulation 91 g.  
„Groß-Dosis-Positive“ mit großen Dosen reinokuliert.

	$\frac{28}{4}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{11}{4}$	$\frac{18}{4}$	$\frac{25}{4}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{9}{5}$	$\frac{16}{5}$
	r l	r l	r l	r l	r l	r l	r l	r l
1								
2								
3								
4								
5								
6								

Fig. 39. Resultat der Reinokulation von „Groß“- und „Klein-Dosis-Positiven“ von Jensens Rattensarkom mit großen und kleinen Dosen desselben Tumors. Wenn „Groß-Dosis-Positive“ mit großen Dosen reinokuliert werden, wachsen die sekundären Tumoren nicht so schnell wie die Kontrollen; der größte sekundäre Tumor ist aber in der Ratte, die den größten primären Tumor trägt, zu finden. Wenn „Klein-Dosis-Positive“ mit großen Dosen reinokuliert sind, wachsen die sich entwickelnden sekundären Tumoren ungefähr ebenso schnell wie die Kontrollen, und hier wiederum am besten in den Ratten, die die größten primären Tumoren tragen. Wenn „Klein-Dosis-Positive“ mit kleinen Dosen reinokuliert werden, entwickeln sich sekundäre Tumoren nur in Ratten mit den größten primären Tumoren.

In Ratten 1—6 ist die erste Impfung am 18. März 1908 mit 0,2 ccm von Jensens Rattensarkom vorgenommen, in Ratten 7—11 und 12—17 die erste Impfung nur mit 0,01 g desselben Tumors. (Exp. J.R.S/10 A.) Die Ratten 1—6 und 7—11 wurden am 7. April 1908 mit großen Dosen (0,2 ccm Emulsion), die Ratten 12—17 mit kleinen Dosen (0,01 g) von Jensens Rattensarkom in die linke Axilla reinokuliert. Als Kontrollen für die Reinokulation dienen die Ratten 18—25 und 26—33, resp. 18—25 für die großen Dosen (0,2 ccm) und 26—33 für die kleinen Dosen (0,01 g). (Exp. J.R.S/11 A.)

„Klein-Dosis-Positive“ mit großen Dosen reinokuliert.

				—
				.
				—
				.
				—
				⊙
				—
				⊙
				—
				⊙
				⊙
				⊙
				⊙
.	.	.	.	.
7	8	9	10	11

Fig. 39. Fortsetzung. Figurenerklärung s. p. 531.

Ein negatives Resultat bei Reinokulation ist, aller Wahrscheinlichkeit nach, durch sekundäre auf Tumorresorption folgende Veränderungen in den Tieren bedingt, und folglich von dem Vorhandensein eines wachsenden Tumors unabhängig. Die beobachteten quantitativen Beziehungen zwischen der ein-

„Klein-Dosis-Positive“ mit kleinen Dosen reinokuliert.

		◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	
•					
◐		◐	◐	◐	
•					
◐		◐	◐	◐	
•	•				
◐	◐	◐	◐	◐	◐
◐	◐	◐	◐	•	◐
◐	•	◐	•	•	•
•	•	•	•	•	•
12	13	14	15	16	17

Fig. 39. Fortsetzung. Figurenerklärung s. p. 531.

geführten Menge von Geschwulstgewebe und dem Grad der erhaltenen Resistenz ebensowohl in mit Tumoren behafteten wie auch in normalen Tieren demonstrieren, daß wir es hier mit einer aktiven Immunität zu tun haben.

Positive Reinokulation entspricht Metastasenbildung und

Durchschnittsgewicht 67,3 g.  
Kontrollen für Reinokulation der Ratten 1—11 mit großen Dosen.
























	18/4		25/4		2/5		9/5		16/5		28/5	
	r	l	r	l	r	l	r	l	r	l	r	l
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												

Fig. 39. Fortsetzung. Figurenerklärung s. p. 531.



Figure 1 is a 7x6 grid of 42 cells, labeled with hours 26 to 33 on the left. The grid shows the development of a single larva over time. The cells are arranged in 7 rows and 6 columns. The rows are labeled 26, 27, 28, 29, 30, 31, and 32. The columns are labeled 1, 2, 3, 4, 5, and 6. The cells show the progression of a larva from a small dot to a large, dark, elongated shape. A scale bar at the bottom indicates 10 cm.

Hour	Col 1	Col 2	Col 3	Col 4	Col 5	Col 6
26	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
27	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
28	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
29	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
30	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
31	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
32	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot
33	Small dot		Small dot		Small dot	Large dot

10 cm.

Fig. 39. Fortsetzung. Figurenerklärung s. p. 531.

Durchschnittsgewicht bei der Reinokulation 15 g.

	13 / 1	20 / 1	27 / 1	3 / 2	10 / 2	17 / 2	24 / 2
	r   l	r   l	r   l	r   l	r   l	r   l	r   l
1	!	!	!	!	!	!	!
2	!	!	!	!	!	!	!
3	!	!	!	!	!	!	!
4	!	!	!	!	!	!	!
5	!	!	!	!	!	!	!
6	!	!	!	!	!	!	!
7	!	!	!	!	!	!	!
8	!	!	!	!	!	!	!

10 cm.



Fig. 40. Die Einschaltung einer immunisierenden Inokulation von 0,10 ccm Spontantumor ändert nicht die Empfänglichkeit positiver Mäuse für eine zweite Impfung mit demselben Tumor (Plattenepithelkrebs).

Mäuse 1—8 waren am 2. Jan. 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs (Tumor 32) in die rechte Axilla geimpft. (Exp. 32/22 B.) 13 Tage später erhielten sie 0,10 ccm Spontantumor subkutan am Rücken und noch 10 Tage später, am 25. Jan. 1908, wurden sie mit 0,025 ccm Plattenepithelkrebs in die linke Axilla reinokuliert. Gleichzeitig, am 25. Jan. 1908, wurden 15 normale Mäuse (9—23) mit derselben Dosis (0,025 ccm) desselben Materials in die linke Axilla als Kontrolle geimpft. (Exp. 32/23 B.)

ermöglicht experimentelles Arbeiten über die Mittel, wodurch diese verhindert werden kann. Wenn wir durch irgendwelche Mittel positive Reinokulation zu verhüten vermögen, in Fällen, in welchen sie gewöhnlicherweise gelingt, kann die Möglichkeit nicht abgewiesen werden, daß auch die Metastasenbildung in gleicher Weise unter Kontrolle gebracht werden kann.

Durchschnittsgewicht 17,6 g.

	$\frac{3}{2}$		$\frac{10}{2}$		$\frac{17}{2}$		$\frac{24}{2}$	
	r	l	r	l	r	l	r	l
9		!		?				
10		!		!				
11		,		!		!		!
12		!		?				
13		!		!		!		!
14		!		,		;		
15		!		!		!		!
16		!		,		,		,
17		;		,		,		
18		;		—		—		—
19		!		—		—		—
20		/		—		—		
21		;		—		—		
22		,		—		—		—
23		—		—				

10 cm.



Es zeigen sich aber erhebliche Schwierigkeiten beim Versuch, durch dieselben Mittel, durch welche der Erfolg der ersten Inokulation verhütet werden kann, den Erfolg einer zweiten Impfung von positiven Tieren zu verhindern (Fig. 40). Schöne ist ähnlichen Schwierigkeiten begegnet, wenn er positive Tiere, denen die Tumoren durch Operation entfernt waren, zu immunisieren versuchte.

Dosierung und Zeitintervall sind auch hier Faktoren von großer Bedeutung, und diesbezügliche Untersuchungen sind noch im Gange. Die Kompliziertheit der Versuche allein macht es schwierig, die Resultate zu deuten und fordert zur Vorsicht auf. Bis jetzt zeigen unsere Versuche nur die Möglichkeit, Resistenz einzuschalten (siehe Fig. 41). Weiter zeigen sie, daß ein abnormales Resultat ab und zu erhalten wird, und eine Behandlung, die in normalen Individuen starke Resistenz herbeiführt, vermag in positiven

Durchschnittsgewicht 16,5 g.

	$\frac{3}{2}$	$\frac{11}{2}$	$\frac{18}{2}$	$\frac{24}{2}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{13}{3}$
	r l	r l	r l	r l	r l	r l
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Fig. 41. Figurenerklärung siehe p. 539.

11	?	!	!	!
12	!	!	!	!
13	!	!	!	!
14	!	!	!	!
15	!	!	!	!
16	!	!	!	!
17	!	!	!	!
18	!	!	!	—
19	:	:	:	—

10 cm.



Fig. 41. Resistenz gegen nachfolgende Impfung mit Plattenepithelkrebs (Tumor 32) scheint nach dem Erscheinen der primären Tumoren sich entwickeln zu können als Folge von Vorbehandlung mit Mäuseembryohaut, unmittelbar vor der ersten Impfung injiziert.

Mäuse 1—5, normale Mäuse.

Mäuse 6—10, mit Mäuseembryohaut 2 Tage vor der Impfung inokuliert.

Am 24. Jan. 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs in die rechte Axilla inokuliert. (Exp. 32/17 J.)

Mäuse 1—10 am 14. Febr. 1908 mit 0,025 ccm Emulsion von Plattenepithelkrebs in die linke Axilla reinokuliert; gleichzeitig und mit derselben Dosis desselben Materials sind die Mäuse 11—19 als Kontrollen geimpft worden. (Exp. 32/24 C.)

Tieren gelegentlich eine relative Ueberempfindlichkeit hervorzurufen. Diese Beobachtung mahnt zur Vorsicht gegen frühzeitige Schlüsse.

Die genannten Tatsachen in bezug auf Geschwulstresistenz und Empfänglichkeit, soweit sie zur Zeit bekannt sind, stützen nicht die Theorie, daß die biologischen Charaktere maligner Geschwülste durch das Vorhandensein eines Infektionsstoffes oder Virus bedingt sind. Während in vielen Beziehungen Resistenz gegen Geschwulstimpfung als eine aktive Immunität angesehen werden muß, ist die wahre Natur dieser Veränderung noch nicht bewiesen worden. Die quantitativen Beziehungen zwischen Grad der Resistenz und Menge des resorbierten Gewebes machen es wahrscheinlich, daß aktive Substanzen in den Körperflüssigkeiten eine Rolle spielen könnten.

Es ist aber bis jetzt nicht gelungen, irgendwelche

Antikörper im Serum natürlich resistenter oder künstlich immunisierter Mäuse nachzuweisen. Durch histologische Untersuchung der Pfropfungen in immunen Mäusen kann kein direkter Beweis ihres Vorhandenseins erbracht werden. Ausgedehnte Untersuchungen Russells<sup>1)</sup> über die an der Impfstelle in normalen und Immuntieren sich abspielenden Vorgänge haben als wesentliches Resultat ergeben, daß in Immuntieren sowohl nach Vorbehandlung mit krebsigen wie mit normalen Geweben die von uns<sup>2)</sup> schon oft betonten und neuerdings auch von Gierke und Russel aufs deutlichste hervorgehobenen spezifischen Stroma- und Blutgefäßreaktionen ausbleiben. Wenn die Impfstelle bei immunen Tieren fremder Art untersucht wird, z. B. Ratten, die immun gegen Mäusetumoren oder -gewebe sind, so ist eine direkte tödliche Wirkung auf die Tumorzellen festzustellen: in derselben Tierart dagegen fallen alle Beweise dafür weg. Die Tumorzellen leben weiter: nur scheint ihre Fähigkeit, Fibroblasten und Angioblasten für ein neues Stützgewebe anzulocken, vollständig gelähmt zu sein; anstatt dessen spielen sich schließlich die Prozesse, die wir bei der Spontanheilung beschrieben haben, mit Ausgang in gewöhnliche Narbengewebe, ab. Durch diese Tatsachen ist es selbstverständlich, warum unsere jetzigen Bemühungen, die Schutzvorrichtungen des Körpers nachzuahmen, vorläufig hauptsächlich gegen neu eingeführte Zellen wirksam sind, dagegen auf schon vaskularisierte Tumoren weniger Einfluß entfalten.

Versuche, um solche Substanzen auf indirektem Wege nachzuweisen, haben ebenfalls negative Resultate ergeben. Wir haben versucht, ob neugeborene Junge von Müttern, die nach wiederholten Geschwulstinjektionen hochresistent waren, eine höhere Resistenz als normale Mäuse von demselben Alter zeigen. Ehrlichs Experimente über Ricinimmunität zeigten, daß Antikörper von der Mutter auf das Kind durch die Milch übertragen werden können. Es wäre

1) The nature of the resistance to the inoculation of cancer. Third Scientific Report.

2) Bashford, Murray and Cramer, Source of the Constituent Elements of New Growths obtained by Artificial Propagation. Second Scientific Report of the Imperial Cancer Research Fund, Part II, London 1905. —, Stroma is a Specific Reaction on the part of the Host. Ibidem. u.s.w.

auch denkbar, daß solche Stoffe durch den Placentarkreislauf übertragen werden könnten.

Anzahl der immuni- sierenden Injektio- nen der Mutter mit 0,25 ccm von Jen- senschem Carcinom	Anzahl der Jungen	Alter in Wochen	Resultat von der Impfung der Jungen mit 0,02 g vom Jensenschen Tumor.			
			10 Tage nach der Impfung		17 Tage nach der Impfung	
1mal	3	3—4	+	—	+	—
4 "	4	3	3	1	3	1
5 "	2	5—6	1	1	1	1
6 "	6	2 (fortwährend saugend)	6	0	5	0
6 "	2	3—4	2	0	2	0
6 "	4	4—5	2	2	2	2
Summe	21	—	17	4	15	5
Kontrollen						
12 normale Jungen möglichst gleicher Größe			4	3	4	3

Die Tabelle zeigt die Resultate eines solchen Versuches. 21 Junge, 2—6 Wochen alt, von Mäusen, die wiederholt Injektionen von 0,25 g von Jensens Tumor bekommen hatten, wurden alle mit 0,02 g von Jensens Tumor injiziert. Gleichzeitig wurden 12 normale Mäuse von gleichem Alter als Kontrolle mit demselben Material geimpft. Die Resultate zeigen, daß Junge von immunen Eltern ebenso empfänglich wie normale Mäuse sind. Auch scheinen keine Antikörper in der Milch vorhanden zu sein, da 6 von diesen Jungen, 2 Wochen alt, sämtlich schnell wachsende Tumoren aufwiesen, während sie gleichzeitig die hochimmune, 6mal mit 0,25 ccm von Jensens Tumor vorbehandelte Mutter säugte.

Die für die künstlich hervorgerufene Geschwulstresistenz verantwortlichen Prozesse zeigen manche neue Charaktere im Vergleich mit den viel studierten Reaktionen gegen Infektionsträger und ihre Produkte. Sie zeigen einen sehr hohen Grad von Spezifität, sowohl in bezug auf die Tier-species als auch auf die individuellen Gewebe einer Species. Es ist nicht möglich gewesen, sie in neuen Tieren durch passive Immunisierung mit den Körperflüssigkeiten resistenter

Mäuse hervorzurufen; sie scheinen nicht von hochresistenten Müttern auf ihre Nachkommenschaft übertragen zu werden; und noch weniger ist es bis jetzt gelungen, diese Reaktionen in vitro nachzuahmen. Die einzige beobachtete Aenderung ist eine aktive Immunität in den resistenten Tieren selbst, nur durch den Gebrauch lebender Zellen als Indikator nachzuweisen.

Nichtsdestoweniger sind die Aenderungen, die künstlich hervorgerufen werden können, eklatant demonstrierbar. Das Bestehen von quantitativen Beziehungen zwischen Resistenzgrad und Menge des eingeführten krebsigen oder normalen Gewebes, sowie Größe der Impfdosis, mit welcher die Resistenz erprobt wurde, ist nachgewiesen worden. Wir sind zurzeit nicht imstande, zu entscheiden, ob diese Phänomene von in dem resistenten Tiere gebildeten und mit Molekülgruppen in den Carcinomzellen reagierenden Substanzen abhängen oder weniger leicht definierbare Aeüßerungen einer vitalen Tätigkeit der Zellen sind.

Die experimentelle Krebsforschung hat uns schon vieles gelehrt über früher unbekannte das Krebswachstum hemmende oder fördernde Vorrichtungen des Körpers, auch hat sie unsere Aufmerksamkeit auf die wechselnden biologischen Eigenschaften der Krebszellen selbst und besonders auf die negative Wachstumsphase, während welcher die Krebszellen leichter wachstumshemmenden Einflüssen erliegen, gelenkt. Durch die Lösung der aufgeworfenen neuen Fragen, die durch morphologische Untersuchungen allein nicht aufgetaucht wären, dürfen wir ein noch viel tieferes Eindringen in die Schutzvorrichtungen des Körpers als Zellenstaat erwarten.

Die beschriebenen Beobachtungen zeigen, daß kaum in der Richtung eines Heilserums nach der Art eines antitoxischen Fortschritte zu erwarten sind, da die Körperflüssigkeiten keine resistenzsteigernden Eigenschaften in vitro oder auf andere Tiere übertragbare besitzen, auch kaum in der Richtung einer Vaccine, die die Entwicklung spontaner Krebse verhüten würde. In früheren Publikationen ist von uns mitgeteilt worden, daß gegen Geschwulstimpfung hochresistente Mäuse später spontane Tumoren entwickeln können, eine Beobachtung, die neulich von Thorel bestätigt wurde.



Gegen eine voreilige Anwendung irgendeines dieser Resultate in der Praxis muß ausdrücklich gewarnt werden, bis unsere Bemühungen, die Versuche auf Tiere mit spontanen, im Gegensatz zu transplantierten Tumoren auszudehnen, zu unzweideutigen Resultaten geführt haben; aber die erhaltenen Resultate ermutigen uns zu fortgesetzter Arbeit in der Hoffnung, daß es schließlich möglich sein wird, auch das Wachstum und besonders die Metastasierung der menschlichen Tumoren zu beherrschen. Bevor dieses Ziel erreicht werden kann, wird es nötig sein, den Mechanismus, durch welchen Mäuse künstlich refraktär gemacht werden, und gleichzeitig denjenigen, der für spontane Heilung verantwortlich ist, näher kennen zu lernen. Die Hoffnung, die experimentellen Resultate praktisch zu verwenden, muß in der Richtung von Nachahmung oder Verstärkung der natürlichen Heilungsvorgänge liegen.

#### **Zusammenfassung.**

Aus dem Studium von 70 transplantablen Tumoren von Maus und Ratte, welche Adeno- und Alveolärcarcinome der Mamma, Plattenepithelcarcinome, Spindelzellen-, Polymorphzellen- und Chondro-osteoid-Sarkome umfassen, sind wir zu folgenden Betrachtungen gelangt.

1) Die verschiedenen Primärtumoren zeigen verschiedene Stufen von bösartiger Umwandlung des Gewebes und diese primären Unterschiede zwischen den spontanen Tumoren, selbst desselben Organs, bleiben in den meisten Fällen, mit nur geringen Schwankungen während der fortgesetzten experimentellen Fortpflanzung bestehen.

2) Die höhere Angangsfähigkeit und größere Wachstums-schnelligkeit im Verlauf der fortgesetzten Ueberimpfung führen wir im wesentlichen auf eine vollkommenere Anpassung der Zellen an neue Wirtstiere und damit verbundene Erhöhung der anfänglichen wirksamen Dosis mit Verminderung der simultanen Immunisierung zurück, ohne daß eine wesentliche Aenderung der biologischen Charaktere der Zellen dabei beobachtet wird. In einzelnen Stämmen jedoch werden tiefergehende Aenderungen der Zellcharaktere während der künstlichen Fortpflanzung angetroffen, wie dies z. B. in der Ent-

wicklung von Sarkom und auch im Verlust des hämorrhagischen Charakters bei gewissen Mammacarcinomen zutage tritt.

3) Die bösartige Wucherung scheint nicht eine kontinuierlich vegetative zu sein. Die große Mehrzahl der Tumoren weist während der Fortpflanzung ausgesprochene Schwankungen ihrer vitalen Prozesse auf. Diese Schwankungen äußern sich durch Steigen und Sinken der prozentualischen Angangsfähigkeit, durch Perioden des rascheren und langsameren Wachstums, und durch wechselnde Empfindlichkeit gegen Veränderungen der Dosis, der Tierrasse und der Methodik überhaupt.

4) Natürliche Resistenz gegen Tumorimpfung beruht nicht auf dem Vorhandensein von natürlichen Antikörpern im Serum normaler Tiere, auch nicht auf einer wechselnden Avidität der Körperzellen für Nährstoffe. Verschiedene Tiere reagieren mit wechselnder Energie auf die Resorption von Tumorgewebe, und die natürliche Resistenz der Tiere wird durch die wechselnde Wirkung der simultanen Immunisierung auf noch nicht vollständig etablierte Geschwülste befriedigend erklärt. Ältere Tiere bieten den Geschwulstzellen eine trägere Stromareaktion dar, und deswegen sind im allgemeinen ältere Tiere gegen Tumorimpfungen weniger empfindlich.

5) Eine gesteigerte Resistenz gegen Tumorimpfung kommt zum Vorschein unter folgenden Bedingungen. a) Nach Resorption von Tumorgewebe derselben Tierspecies; dagegen führt die Resorption von Tumormaterial von fremden Tierarten keine (bezw. verminderte) Resistenz herbei. Diese Resistenz ist um so höher, je näher histologisch verwandt das resorbierte Tumormaterial dem zur Resistenzprüfung verwendeten Tumor ist. b) Nach Resorption normaler Gewebe derselben Tierart und dabei wie mit der nach Tumorresorption hervorgerufenen Resistenz, auch spezifisch, und um so stärker, je näher Normalgewebe und Impftumor histologisch verwandt sind.

6) In vielen Fällen ruft Resorption krebsiger oder normaler Gewebe fremder Tierarten, anstatt Resistenz, Ueberempfindlichkeit der vorbehandelten Tiere hervor. Behandlung mit histologisch verschiedenen normalen Geweben derselben Tierart kann auch gelegentlich Hypersensibilität zur Folge haben.

7) Bei jeder Impfung (wenn nicht minimalste Dosen verwendet werden) findet eine Resorption von Tumorgewebe statt, und im Falle, daß die Anfangsdosis eine beträchtliche war, kann diese Resorption eine Steigerung der Resistenz für spätere Impfungen herbeiführen. Sie kann sogar einen Wachstumsstillstand oder totales Verschwinden gut angangener Tumoren bedingen. Diese simultane Immunisierung spielt bei der Reinokulation positiver Tiere eine große Rolle, wie mit wechselnden Dosen ausgeführte Experimente lehren. Trotz dieser Erfahrungen bleibt es schwierig, bei positiven Tieren mit den gewöhnlichen, auf nicht tumortragenden Tieren erfolgreichen Methoden Resistenz zu erzeugen bzw. zu steigern. Daß dieselbe überhaupt möglich ist, deutet auf die Möglichkeit hin, Metastasenbildung endlich verhindern zu können.

8) Im Serum hochresistenter Tiere sind keine Substanzen demonstrierbar, welche in vitro oder in corpore neuer Tiere das Angehen der Impfungen verhindern, geschweige denn das Wachstum progressiver Tumoren hemmen. Selbst die Jungen, von resistenten Müttern geboren, sind ebenso empfindlich wie gleichaltrige Junge normaler Eltern. Resistenz ist nur als eine aktiv erworbene Veränderung aufzufassen, welche die chemotaktische Wirkung der Krebszellen auf die Gewebe (Bindegewebe und Gefäße) des Wirtstieres ändert. In solche Tiere eingeführt, erliegen die einer genügenden Ernährung entzogenen Krebszellen den gewöhnlichen gegen Fremdkörper wirksamen Schutzvorrichtungen des Körpers.

Die beigegebenen Abbildungen (41) sind genaue (mit Maßstab versehene) Wiedergaben der Versuchsscharten. Sie zeigen Angangsprozentsatz und Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren, mit allen Einzelheiten der Vorbehandlung und Impfung der Tiere. Für eine weniger reduzierte Reproduktion dieser Protokolle sei auf den Third Scientific Report of Imperial Cancer Research Fund verwiesen.

[Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität Prag;  
Vorstand: Prof. F. Hueppe.]

**Versuche über bakteriolytische Immunkörper mit besonderer Berücksichtigung des normalen Rinderserums.**

Von Prof. Dr. Oskar Bail und Dr. Kyuzo Tsuda.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Jan. 1909.)

Bei der Entstehung von Antikörpern in Tieren, welche mit Antigenen vorbehandelt sind, fallen besonders zwei Eigentümlichkeiten auf. Zunächst die Spezifität der Antikörper, die ja keine ganz absolute, aber doch eine stets unverkennbare ist, und dann das fast regelmäßig bestehende quantitative Mißverhältnis zwischen der meist sehr geringen Menge injizierten Antigens und der relativ ungeheuren Menge des schließlich gebildeten Antikörpers. Schon sehr frühzeitig hat man für die Erklärung der Spezifität angenommen, daß die Antikörper in letzter Linie nichts anderes als Abkömmlinge der Antigene seien, modifiziert durch den Einfluß des Organismus, in dem sie sich bilden; Buchner und Metschnikoff sind als Vertreter dieser Anschauung zu nennen. Aber der zweite zu erklärende Punkt sprach so sehr gegen diese Anschauung, wie namentlich Knorr für das Tetanusantitoxin hervorgehoben hatte, daß sie sich nicht durchsetzen konnte. An ihre Stelle trat die Erklärung der Antikörperbildung durch die Seitenkettentheorie Ehrlichs. Für diese ist die Antigeneinführung eigentlich nur ein Reiz, welcher in besonderer Weise auf Zellen einwirkt, an ihnen einen Verlust von Seitenketten hervorruft. Der Ersatz derselben im Uebermaß, der Uebergang der neugebildeten ins Blut erklärt das Entstehen sehr großer Mengen von Antikörpern ganz befriedigend, während die Erklärung der Spezifität weit weniger Genüge bietet. Sie kann nur dadurch gegeben werden, daß man sehr vielfältige Seitenketten an den Zellen annimmt, und da eine große Zahl von Stoffen antigen wirken, so muß auch die Konstitution des Zellprotoplasmas als eine sehr komplizierte gedacht werden.

Auf verschiedene Weise hat sich die Seitenkettentheorie mit den hie und da auftretenden Schwierigkeiten abgefunden, wovon nicht die Rede sein soll. Jedenfalls ist es für sie bezeichnend, daß sie einen Zusammenhang stofflicher Art der Antikörper mit dem Antigene leugnen muß. Der Antikörper enthält in sich nicht den kleinsten Bruchteil des Antigens, er entsteht ja eigentlich nur als Reaktion auf einen Defekt, den das Antigen in Zahl und Anordnung der normalen Seitenketten setzt. In einer anderen Hinsicht besteht ebenfalls noch eine Schwierigkeit für die Theorie, welche aber bisher weniger erwähnt und beachtet wurde. Durch Einspritzung eines Antigens, z. B. geformter Choleravibrionen, erhielt man nicht einen, sondern drei Antikörper, Agglutinine, Bakteriolyse und Präzipitine, welche nach der herrschenden Ansicht so sehr unabhängig voneinander sind, daß man ihnen ganz verschiedene Konstitution und Wirkungsweise zuschreibt, die also auch von ganz verschiedenen Seitenketten ausgehen müssen. Es muß daher ein und dasselbe Antigenmolekül nacheinander oder nebeneinander drei verschiedene Seitenketten mittels der agglutinogenen, präzipitinogenen etc. Gruppe der Bakteriensubstanz haben besetzen können, was nicht ganz einfach zu verstehen ist.

Schwierigkeiten macht auch die Erklärung der Wirkung normaler Tiersera. Man kann sehr viele Antikörperwirkungen schon in diesen feststellen, und wenn auch gewisse Verschiedenheiten zwischen den normalen und den immunisatorisch erzeugten Antikörpern bestehen mögen, die Analogie beider geht doch sehr weit und wird konsequenterweise auch durch die Seitenkettentheorie betont. Sie findet ja eine sehr wertvolle Stütze für ihre Annahme der unerschöpflichen Vielheit der Seitenketten an den Zellen durch den Nachweis der vielfältigen Antikörper schon im normalen Blute. Es ist aber dabei doch auffallend, daß, wie Bürgi zuerst für die Agglutination planmäßig festgestellt hat, ein normales Tiereserum, welches einen Mikroorganismus stark agglutiniert, auch alle anderen überhaupt agglutinablen stark beeinflusst, ein anderes, welches auf den einen Bacillus nur wenig einwirkt, auch für alle übrigen schwach ist.

Demgegenüber kann allerdings die Seitenkettentheorie darauf hinweisen, daß gewisse Tiere einen regeren Seiten-

kettenwechsel an ihren Zellen haben als andere. Es ist durchaus möglich, daß, wenn ein Tier sehr schnell Seitenketten einer Art produziert und abstößt, dies auch mit Seitenketten anderer Art der Fall ist.

Aber trotz dieser durchaus annehmbaren Erklärung wird man einen Fingerzeig, den schon vorliegende Versuche geben, nicht unbeachtet lassen dürfen, um zu einer anderen Erklärung zu gelangen und diese auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen.

Bürgi hat bereits für seine Versuche die Frage aufgeworfen, ob sie sich nicht durch ein einheitliches Agglutinin am besten erklären lassen; Bail und Hoke haben versucht, die drei Wirkungsarten, welche das Rinder Serum auf Cholera-vibrionen und auf gelöste Cholerasubstanz ausübt, einheitlich aufzufassen als Effekt der Wirkung des Immunkörpers unter Beihilfe des als Ferment erklärten Komplementes. Die Art der Reaktion sei bei Bakteriolyse und Präzipitation, welche besonders untersucht wurden, immer die gleiche, nämlich eine mehr oder minder feste Verbindung zwischen einem Serumbestandteil (dem Immunkörper) und der Bakteriensubstanz; nur das Aussehen der Reaktion ist ein verschiedenes. Diese unitarische Auffassung der Serumaktivität ist sowohl mit der Annahme einer Vielheit wie der einer Einheit der normalen Immunkörper vereinbar: sie besagt nur, daß für die Reaktion mit Cholera z. B. nicht drei verschiedene Seitenketten als Agglutinin, Präzipitin und Bakteriolsin ins Blut abgegeben werden, sondern nur eine einzige, welche je nach den für die Reaktion gegebenen Bedingungen diese oder jene Form der Serumaktivität in Erscheinung treten läßt. Für Typhus kann eine andere Seitenkette daneben mit dem gleichen Wirkungsmechanismus bestehen, für Staphylokokken eine dritte u. s. f.

Aber die Bürgische Feststellung am normalen Serum gilt nicht nur für die Agglutination, sie erstreckt sich auf alle Aeüßerungen der Serumaktivität. Wenn ein Normalserum einen Bacillus stark abtötet, so tötet es auch alle andern, welche ungefähr die gleichen Bedingungen für die Entfaltung der Bakteriolyse darbieten, maximal ab. Ausnahmen von dieser Gesetzmäßigkeit erklären sich durch besondere Beschaffenheit mancher Bakterien. Für die noch sehr wenig untersuchte normale Präzipitation gilt Aehnliches. Ob man

angesichts dieser Tatsachen an der Vielheit der normalen Immunkörper festhalten kann, ist eine Frage, welche erst dann zu beantworten möglich sein wird, wenn für die spezifische Absorption der normalen Serumkörper eine Erklärung gegeben wird. Denn ein mit Choleravibrionen oder mit Choleraextrakt behandeltes Rinderserum ist nur für Cholera wirkungslos geworden, nicht für Typhus, und dieser Befund spricht absolut zugunsten der Ehrlichschen Pluralität.

Gewisse Befunde bei den Versuchen von Bail und Hoke ließen aber auch das Problem der Antikörperbildung wieder in Angriff nehmen. Es stellte sich nämlich heraus, daß das Reaktionsprodukt zwischen Serum und Cholera-substanz, welches je nach der Wirkungsart als Präzipitat oder als Rückstand aufgelöster Vibrionen vorlag, noch eine Wirkung auf frisches aktives Serum ausübt, welche in der eigenartigen Erscheinung der Komplementablenkung am klarsten zutage trat. Mit Sicherheit zu deuten war diese Erscheinung nicht, und das ist auch heute noch, wo bereits Versuche in erweiterter Form vorliegen, unmöglich. Aber das schien auch nicht unmittelbar notwendig gegenüber einer außerordentlich wichtigen Konsequenz. Wenn das Reaktionsprodukt zwischen Serumaktivität und Bacillensubstanz noch nicht das letzte ist, wenn es in irgendeiner Form noch auf die Körpersäfte oder den tierischen Organismus überhaupt wirken kann, dann verliert das eingangs erwähnte Mißverhältnis zwischen der kleinen Menge injizierten Antigens und der großen Menge der gebildeten Antikörper viel von seiner Unerklärlichkeit. Denn das Antigen wird ja durch die erste Reaktion mit dem Serum nicht beseitigt, es verändert sich zwar, aber es übt noch weiter Einfluß auf den Tierkörper aus, und da man nicht weiß, wann es definitiv wirkungslos wird, so hat man Ursache, eine fortgesetzte Antikörperproduktion auch stofflich mit der einmaligen Antigeninjektion in Zusammenhang zu bringen.

Das erschien bedeutungsvoll genug zu sein, um eine breit angelegte Untersuchung zu rechtfertigen, deren erste Protokolle hier mitgeteilt werden sollen, noch ohne auf die daraus möglichen Schlüsse allzu sehr einzugehen.

Dabei stellte sich alsbald heraus, daß auch das Problem der Spezifität der Antikörperbildung einer neuen Untersuchungs-

weise zugänglich sei, und zwar im Anschluß an frühere Versuche von Pfeiffer und Friedberger, zu deren Wiederaufnahme die eigenen, im Reagenzglase erhaltenen Resultate führten.

Pfeiffer und Friedberger<sup>1)</sup> fanden, daß der spezifische Choleraimmunkörper in der Meerschweinchenbauchhöhle nach dem Ablauf der durch ihn bewirkten Vibriolyse nicht verloren geht. Denn wenn man jetzt normale Vibrionen neuerlich einspritzt, so verfallen diese in kurzer Zeit ebenfalls der Granulabildung, und das Versuchstier überlebt. Genauere quantitative Prüfungen, welche Pfeiffer und Friedberger mit aller bei solchen Versuchen überhaupt möglichen Exaktheit anstellten, ließen erkennen, daß bei der Cholera bakteriolyse ein Verlust von Immunkörpern wahrscheinlich gar nicht eintritt, daß also die gesamte Menge des Immunserums nach Auflösung einer ersten Menge von Vibrionen zur gleichen Aktionsfähigkeit wieder frei wird.

Die Befunde Pfeiffers und Friedbergers im Tierkörper führten die Autoren dazu, eine fermentartige Natur der Serumimmunkörper in Erwägung zu ziehen, ohne daß sie sich aber darüber mit voller Bestimmtheit aussprachen.

Jedenfalls sind die Versuche von großer Bedeutung, sobald man ihre Konsequenzen erwägt. Denn wenn der Immunkörper bei der Bakteriolyse in der Meerschweinchenbauchhöhle abgesprengt und zu neuer Tätigkeit frei wird, so ist die Frage, ob er dabei unverändert geblieben ist oder nicht. Die gleiche Frage gilt auch für die Cholerasubstanz selbst, bei der man aber eine Veränderung durch die stattgehabte Reaktion von vornherein annehmen muß. Derartige Ueberlegungen rechtfertigten eine genauere Untersuchung dieses eigenartigen Phänomens.

Versuche, welche sich zunächst an die originalen von Pfeiffer und Friedberger anschlossen, lieferten das gleiche Resultat. Sensibilisiert man Choleravibrionen mit Immunserum, entfernt durch sorgfältiges Waschen jeden Rest der etwa noch anhaftenden wirksamen Flüssigkeit und führt dieselben in die Bauchhöhle eines normalen Meerschweinchens ein, so erfolgt in wenigen Minuten typische und vollständige

1) Centralbl. für Bakt., Orig., 1903, Bd. 34, p. 77 ff.



**Bakteriolyse.** Wenn man jetzt neuerdings Choleravibrionen, die in keiner Weise vorbehandelt sind, einführt, so werden auch diese typisch aufgelöst, und das Versuchstier überlebt die sonst tödliche Injektion. Der Immunkörper zu dieser Auflösung kann auf keine andere Weise als durch die erste Injektion der sensibilisierten Vibrionen in das Tier hineingelangt sein, er muß von diesen freigegeben und wieder aktionsfähig geworden sein. Pfeiffer und Friedberger hatten bereits mit der Genauigkeit, wie sie bei solchen Versuchen überhaupt erreicht werden kann, nachgewiesen, daß der gesamte ursprünglich in Tätigkeit getretene Immunkörper wieder frei wird.

Es läßt sich leicht zeigen, daß nebeneinander die Losspaltung des ursprünglich gebundenen Immunkörpers und die neue Anlagerung desselben an frische Vibrionen stattfinden kann. Man erreicht dies durch gleichzeitige Injektion sensibilisierter und dann gewaschener und normaler Vibrionen.

**Versuch I.**  $\frac{2}{6}$  Kultur Cholera in 2 ccm Kochsalzlösung mit 0,2 ccm Immunsérum versetzt und 1<sup>h</sup> bei 40° gehalten. Es erfolgt stärkste Agglutination. Der Satz wird 5mal mit Kochsalzlösung gewaschen und einem Meerschweinchen<sup>1)</sup> injiziert.  $\frac{1}{6}$ h später waren weder Vibrionen noch Granula mehr mit Sicherheit im Exsudate zu finden, das nur einzelne Endothelien und Lymphocyten enthielt. Jetzt erfolgte die Injektion von  $\frac{2}{6}$  Kultur lebender Vibrionen. Nach 10' fanden sich neben vielen beweglichen Vibrionen einzelne Granula. Nach  $\frac{1}{2}$ h war die Zahl der Vibrionen sehr gesunken, die der Granula stark vermehrt. Nach 1<sup>h</sup> waren bis auf einige schlecht erhaltene Vibrionen nur Granula vorhanden. Nach 3 $\frac{1}{2}$ h war das Bauchhöhlenexsudat eitrig, ohne Granula oder Vibrionen. Das Tier bot das Bild einer ziemlich schweren Choleraperitonitis, erholte sich aber rasch.

**Versuch II.** Verwendet werden Aufschwemmungen lebender (und mit Chloroform abgetöteter Vibrionen, denen für  $\frac{2}{6}$  Kultur 0,1 ccm Immunsérum zugesetzt wird. Während des 1<sup>h</sup> Aufenthalts bei 40° erfolgt rasche und vollständige Agglutination. Die Vibrionen werden gewaschen<sup>2)</sup> und 2 Meerschweinchen injiziert. 10' später finden sich in der Bauchhöhle nur vereinzelte Granula.  $\frac{1}{2}$ h nach dieser Injektion erfolgt eine solche von je  $\frac{2}{6}$  Kultur lebender normaler Vibrionen, welche nach 1<sup>h</sup> bei beiden Tieren

1) Alle zu diesen Versuchen benutzten Meerschweinchen hatten das Gewicht von ca. 200 g.

2) Die Waschwässer wurden stets auf Agglutination geprüft. Das erste Waschwasser agglutinierte noch manchmal in geringem Grade, das letzte niemals mehr.

völlig in Granula umgewandelt sind. Beide Tiere waren nach 4<sup>h</sup> typisch krank, erholten sich aber. — Durch einen Agglutinationsversuch wurde ungefähr der Verlust an Serumaktivität infolge der Bakterienbehandlung bestimmt. Von einer Kontrollprobe der Immunserumverdünnung agglutinierte noch die 0,0005 cem Immunserum entsprechende Menge vollständig; nach Behandlung mit Chloroformvibrionen war der Wert auf 0,025, mit lebenden Vibrionen auf 0,01 cem gesunken. — Das Meerschweinchen, welches zuerst sensibilisierte, dann lebende Vibrionen erhalten hatte, wurde nach 4<sup>1/2</sup>—5<sup>h</sup>, also zu einer Zeit, wo die Bakteriolyse längst abgelaufen war, verblutet. In der Bauchhöhle fanden sich ca. 3 cem Exsudat vor, mit Flöckchen, die aus Leukocyten bestanden, wie überhaupt die nicht übermäßig zahlreichen Leukocyten fast nur in Klumpen beisammenlagen. Vibrionen und Granula fanden sich weder in der Flüssigkeit noch auf Ausstrichen des Netzes vor. Das Exsudat und das Serum des Tieres wurden auf ihre Agglutinationswirkung geprüft. Ersteres agglutinierte auch in der Menge von 0,5 cem nicht, letzteres in der Menge von 0,5 und 0,25 cem. Präzipitable Cholerasubstanz (Zusatz von Immunserum) enthielt das Exsudat nicht.

Versuch III. Eine Agarkultur Cholera wird in 4 cem Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in zwei Hälften geteilt und zu jeder 0,1 cem Immunserum zugesetzt. Nach 4-maliger Waschung der stark agglutinierten Vibrionen werden sie 2 Meerschweinchen ip.<sup>1)</sup> injiziert. Bei beiden Tieren sind nach <sup>1</sup>/<sub>4</sub><sup>h</sup> nur Granula vorhanden, deren Zahl sich nach 1<sup>h</sup> stark vermindert hat. Jetzt wird das eine Tier verblutet, während das andere Tier 1 Oese lebender Vibrionen ip. erhielt. <sup>1</sup>/<sub>4</sub><sup>h</sup> später sind die meisten Vibrionen zu Körnchen geworden, nach 35' finden sich fast nur solche mehr vor, nach 3<sup>h</sup> sind sie im dünn-eitrigen Exsudate nicht mehr zu finden. Das Tier war, trotz der großen Vibrionenmenge, die es im ganzen erhalten hatte, nicht auffällig krank. — Das Serum des verbluteten Meerschweinchens agglutinierte in der Menge von 0,25 cem nach längerer Zeit fast vollständig, nicht mehr in der Menge von 0,1 cem. Die 1 cem betragende Flüssigkeit in der Bauchhöhle des Tieres wurde mit 1,5 cem Spülwassers der Bauchhöhle versetzt, so daß das ursprüngliche Exsudat mit ungefähr gleichviel Kochsalzlösung verdünnt war. In diesem Zustande agglutinierte es mit 0,25 cem nach 24<sup>h</sup> fast vollständig, sehr schwach mit 0,1 cem. — Präzipitable Cholerasubstanz enthielt das Exsudat nicht. — Die Untersuchung der Immunserumverdünnung, welche zur Sensibilisierung der Vibrionen gedient hatte, ergab, daß die 0,01 cem Immunserum entsprechende Menge nur noch minimal agglutinierte, ein Reaktionsgrad, der bei unveränderten Immunseren erst in der Menge von 0,0001 cem so schwach wird.

Versuch IV. Eine Agarkultur Cholera wird in 1 cem NaCl-Lösung aufgeschwemmt und verteilt:

- |            |           |            |           |             |       |   |   |
|------------|-----------|------------|-----------|-------------|-------|---|---|
| 1) 0,2 cem | + 0,1 cem | Immunserum | + 1,7 cem | NaCl-Lösung |       |   |   |
| 2) 0,8     | "         | + 0,1      | "         | "           | + 1,1 | " | " |
| 3) 0       | "         | + 0,1      | "         | "           | + 1,9 | " | " |

1) ip. = intraperitoneal.

Während  $\frac{1}{2}$  h Aufenthaltes bei  $42^{\circ}$  tritt starke Agglutination ein. Die Vibrionensätze werden 4-mal auf der Zentrifuge gewaschen. Ein Meerschweinchen erhielt den Satz von Probe 1 ip. und nach  $\frac{3}{4}$  h, wo die Granula, die sich fast sofort bildeten, bereits sehr vermindert waren,  $\frac{1}{5}$  Kultur lebender Vibrionen. Nach  $\frac{1}{4}$  h fanden sich ca.  $\frac{1}{3}$  Granula vor neben sehr zahlreichen, meist unbeweglichen Vibrionen. Nach  $\frac{5}{4}$  h waren  $\frac{2}{3}$  Granula,  $\frac{1}{3}$  Vibrionen vorhanden, nach  $\frac{5}{4}$  h schienen sich die Vibrionen bei Anwesenheit sehr zahlreicher Granula vermehrt zu haben, nach  $\frac{7}{4}$  h überwogen sie die Zahl der Granula ganz entschieden, während Leukocytose eintrat. Nach  $4\frac{1}{2}$  h machte das Tier einen schwerkranken Eindruck; im Exsudate fanden sich zahlreiche polynukleäre Leukocyten mit starken Granulaphagocyten. Freie Granula fehlten, wohl aber waren einzelne Vibrionen, meist in Form längerer Spirillen, vorhanden. Das Tier überlebte schließlich. — Ein anderes Meerschweinchen, das den Satz von Probe 2 und  $\frac{3}{4}$  h später  $\frac{1}{5}$  Kultur lebender Vibrionen erhalten hatte, zeigte schon nach  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{3}{4}$  h nur Granula. Es wurde ebenfalls, aber weit weniger krank als das vorige, erholte sich sehr rasch. — Die Agglutinationsprüfung der Flüssigkeiten 1—3 nach vorgenommener Sensibilisierung ergab bei 1 Agglutination bis zu der 0,005 ccm, bei 2 bis zu der 0,01 ccm entsprechenden Menge von Immunsérum. Die Probe 3 agglutinierte bis zu 0,0005 ccm.

Versuch V. Eine Agarkultur Cholera wird in 3 ccm Kochsalzlösung mit 0,15 ccm Immunsérum aufgeschwemmt. Die agglutinierten Vibrionen werden gewaschen und in 2 Teile geteilt, von denen der eine gleichzeitig mit lebenden Vibrionen, der andere vorzeitig injiziert wird. Das Meerschweinchen, welches die Hälfte des Satzes gleichzeitig mit der großen Dosis von  $\frac{1}{3}$  Kultur lebender Vibrionen erhalten hatte, zeigte nach  $\frac{1}{4}$  h reichlich Granula neben Vibrionen, die sich nach  $\frac{1}{2}$  h verminderten. Bis zu 3 h fanden sich immer Granula und Vibrionen nebeneinander. Nach 6 h war das Tier schwer krank, zeigte Leukocyten in der Bauchhöhle und nur ganz vereinzelte Vibrionen. Am nächsten Tage war das Tier sehr matt; die Bauchhöhle enthielt sterilen Eiter. Nach ca. 40 h starb es. Das eitrige Bauchexsudat war steril, in Netzausstrichen fanden sich selten einzelne Vibrionen frei und in Zellen. — Das andere Meerschweinchen erhielt den Satz und erst  $\frac{3}{4}$  h später  $\frac{1}{5}$  Kultur lebender Vibrionen ip. Das Bild der Peritonealvorgänge war ganz das gleiche wie beim ersten Tiere. Das Meerschweinchen starb noch in der Nacht, hatte steriles, wenig zellreiches Exsudat. In Netzausstrichen fanden sich reichlich Vibrionen.

Versuch VI. Eine Agarkultur wird mit 4 ccm einer Immunsérumverdünnung 1:10  $\frac{1}{2}$  h bei  $40^{\circ}$  behandelt, dann in 2 gleiche Teile geteilt und zentrifugiert. Die Sätze werden sorgfältig gewaschen. — Ein Meerschweinchen erhält den Satz gleichzeitig mit  $\frac{1}{5}$  Kultur. Nach 35' sind im Exsudate nur selten noch gut erhaltene Vibrionen, massenhaft Granula zu finden; nach 1 h sind nur Granula in bereits verminderter Zahl vorhanden. Das Tier wird nach 6 h bei sterilem, leukocytenreichem Exsudate sehr krank, erholt sich aber schnell. — Ein anderes Meerschweinchen erhält zunächst nur den Satz der anderen Hälfte, der binnen  $\frac{1}{2}$  h völlig bakteriolytisch ist,

und  $\frac{3}{4}$ h später  $\frac{1}{3}$  Kultur lebender Vibrionen. Wieder  $\frac{3}{4}$ h später sind fast nur noch Granula vorhanden. Auch dieses Tier erscheint nach 6h bei sterilem, mäßig leukocytenreichem Exsudate sehr krank, erholt sich aber schnell.

Die vorstehend mitgeteilten Versuchsauszüge bieten eine vollkommene Bestätigung der Befunde von Pfeiffer und Friedberger dar. Dabei sind die zur Injektion benutzten Vibrionemengen so hoch gewählt, daß es vollständig ausgeschlossen ist, die zweite Bakteriolyse etwa durch Immunserumreste zu erklären, welche den sensibilisierten Vibrionen infolge ungenügender Waschung noch angehaftet haben könnten. Es muß daher der von den erstinjizierten Vibrionen gebundene Immunkörper in der Bauchhöhle frei und wieder aktionsfähig geworden sein. Ein Blick auf das Versuchsbeispiel IV zeigt sofort, daß quantitative Verhältnisse dabei eine Rolle spielen: 0,2 ccm einer Vibrionenaufschwemmung hatten von dem zugesetzten Immunserum weit weniger Immunkörper binden und dann im Tierkörper freimachen können, als 0,8 ccm, und dementsprechend war auch der Ablauf der Bakteriolyse.

Von großem Interesse ist auch die Erscheinung, daß Bakteriolyse bereits außerhalb des Tierkörpers sensibilisierter und eine solche normaler Vibrionen nebeneinander in der gleichen Bauchhöhle stattfinden kann (Versuch V und VI). In diesem Falle finden somit am gleichen Orte unter ganz gleichen Verhältnissen zwei verschiedene Reaktionen statt, die Abgabe des Immunkörpers von den sensibilisierten Vibrionen und die Aufnahme desselben durch neue. Das erinnert sofort an die Befunde von Morgenroth<sup>1)</sup> bei sensibilisierten Blutkörperchen. Wenn man zu solchen, in einer völlig von überschüssigen hämolytischen Ambozeptoren befreiten Flüssigkeit, normale Blutkörperchen zusetzt, so treten nach einiger Zeit von den sensibilisierten Zellen Ambozeptoren zu den nicht sensibilisierten über, so daß dann ein Komplementzusatz Lösung der gesamten Blutmenge herbeiführt.

In einem anderen Punkte aber besteht ein Gegensatz zu diesen hämolytischen Ergebnissen. Morgenroth konnte

---

1) Münch. medicin. Wochenschr., 1903, No. 2, p. 61. Arbeiten von Muir, die ein ähnliches Thema behandeln, waren leider nicht im Original zugänglich.

nämlich zeigen, daß ein Ueberspringen des Ambozeptors von einem Blutkörperchen zum anderen nur so lange möglich ist, als die Ambozeptoren noch nicht mit einem Komplement verankert sind. Ist dieses der Fall, so bleiben frisch zugesetzte Blutkörperchen ungelöst.

In der Bauchhöhle von Meerschweinchen tritt aber, wie die unmittelbare Beobachtung zeigt, das Komplement augenblicklich an die Vibrionen heran, und dennoch erfolgt das Abspringen des Immunkörpers in wirkungsfähiger Form. Pfeiffer und Friedberger, aus deren Versuchen übrigens ebenfalls das gleichzeitige Weggehen der Immunkörper von den einen und das Herantreten an andere Vibrionen zu erkennen ist, da sie Emulsionen sensibilisierter Vibrionen mit normalen gleichzeitig einspritzten, weisen darauf hin, daß die Hämolyse mit der Bakteriolyse wegen des Erhaltenbleibens der Stromata nicht zu vergleichen sei.

Auf die sonstigen Versuche, welche sich mit der Abspaltung von Immunstoffen nach vorangegangener Bindung derselben befassen, soll später bei Besprechung der Reagenzglasversuche eingegangen werden.

Es muß übrigens bemerkt werden, daß wenigstens in einem Falle die gleichzeitige Injektion sensibilisierter Vibrionen schlechter gewirkt hatte, als die vorzeitige.

Versuch VII. Eine Agarkultur Cholera wurde mit 5 ccm einer Immunserumverdünnung 1:10  $\frac{1}{2}$  h bei 40° behandelt, der stark agglutinierte Bodensatz in 2 gleichen Hälften gewaschen. Das Meerschweinchen, welches die eine Hälfte gleichzeitig mit  $\frac{1}{4}$  Kultur frischer Vibrionen erhielt, zeigte nach  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{5}{4}$  und  $\frac{6}{4}$  h zunehmende Granulabildung, ohne daß die Vibrionen vollständig verschwanden. Sie vermehrten sich nach dieser Zeit, und es fand offenbar nebeneinander Vermehrung und Granulabildung statt, bis nach ca. 7 h die Vermehrung überwog und zum Tode des Tieres in der Nacht führte. Doch waren auch dann noch im Exsudate Vibrionen zwar zahlreich, aber doch nicht so massenhaft, wie sonst, vorhanden. Das andere Tier löste die sensibilisierten Vibrionen innerhalb  $\frac{3}{4}$  h vollständig auf, und die jetzt eingespritzte  $\frac{1}{4}$  Kultur frischer Vibrionen wurde in  $\frac{1}{2}$  h zu vollständiger Granulabildung gebracht. Das Tier überstand die deutlich eingetretene Choleravergiftung.

Warum dieser Versuch ein abweichendes Resultat gehabt hat, ist nicht zu sagen; immerhin zeigte auch er in seinem Verlaufe, wenn auch nicht im Ausgange, daß doch Bakteriolyse infolge abgesprengter Immunkörper eingetreten sein muß.

Infolge der großen zur Injektion verwendeten Bakterienmengen trat bei fast allen Versuchstieren trotz vollkommener Bakteriolyse das bekannte Symptomenbild der Choleraendotoxinvergiftung auf. Es lag an dem wenig toxischen Stamme, daß die Tiere meistens doch überlebten. Ein anderer, von Herrn Prof. Neufeld freundlichst zur Verfügung gestellter Cholerastamm No. 74 erwies sich als weitaus giftiger und führte regelmäßig zum Vergiftungstode.

Ehe bezügliche Versuchsbeispiele gegeben werden, soll zunächst noch einiger Nebenversuche gedacht werden. Der erste bezog sich darauf, ob durch kurzen oder längeren Aufenthalt der Vibrionen im Immunserum eine Aenderung in der Fähigkeit der Immunkörperabspaltung eintrete, was nicht der Fall war.

Versuch VIII. Eine Agarkultur Cholera wird in 2 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und in 2 gleiche Hälften geteilt. Die Hälfte a erhält sofort einen Zusatz von 1 ccm einer Mischung aus 2,4 ccm NaCl-Lösung + 0,6 ccm Immunserum. Die Probe bleibt mit der anderen Hälfte b, die zunächst ohne Zusatz bleibt, bei hoher Zimmertemperatur stehen und agglutiniert vollständig. Die Hälfte b erhält erst nach ca. 16<sup>h</sup> den gleichen Immunkörperzusatz und wird mit a dann  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> bei 40° gehalten. Nachher werden die Bodensätze sorgfältig gewaschen und 2 Meerschweinchen ip. injiziert. Bei beiden ist nach  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> vollständige Granulabildung eingetreten, und je  $\frac{3}{10}$  Kultur frischer Vibrionen, welche jetzt eingespritzt werden, sind innerhalb  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> fast vollständig zur Granulabildung gekommen. Beide Tiere überlebten.

Die Agglutinationsprüfung ergab, daß die Vibrionen bei langem Kontakt nur wenig mehr Aktivität aus den Immunseren herausgenommen hatten, als bei kurzem. Die Flüssigkeit aus a agglutinierte mit der 0,004 ccm Immunserum entsprechenden Menge nur unvollständig, während die aus b noch fast vollständige bei 0,001 ccm noch unvollständige Agglutination bewirkte und eine Kontrollprobe bis 0,0004 ccm agglutinierte.

Ein anderer Versuch betraf die Frage, ob sich ein Cholera-stamm durch einen anderen vertreten lasse, d. h. ob sensibilisierte Vibrionen des einen Stammes auch gegen einen anderen Stamm schützen. Das gelingt.

Versuch IX. Je  $\frac{2}{6}$  Kultur von Cholera Pfeiffer und Cholera 74 in 2 ccm NaCl-Lösung werden mit 0,2 ccm Immunserum  $\frac{1}{8}$ <sup>h</sup> bei 40° behandelt, wobei unterschiedslos stärkste Agglutination erfolgt. Die Bodensätze werden sorgfältig gewaschen. Das eine Meerschweinchen erhält den Vibrionensatz 74, bringt ihn binnen  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> zur vollständigen Auflösung, zeigt aber schon jetzt Symptome von Peritonitis.  $\frac{3}{10}$  Kultur Cholera Pfeiffer, welche injiziert werden, sind innerhalb einer weiteren  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> völlig in Granula

umgewandelt, aber das Tier wird zusehends immer mehr krank, bietet das typische Bild der Choleravergiftung und stirbt mit steriler Bauchhöhle. Das andere Tier erhält den Vibrionensatz von Cholera Pfeiffer und  $\frac{1}{2}$  h später  $\frac{3}{10}$  Kultur, bringt ebenfalls binnen  $\frac{1}{2}$  h vollständige Granulabildung hervor und überlebt.

Von Wichtigkeit erschien es jetzt, zu untersuchen, wie sich nicht die einfach sensibilisierten Vibrionen, sondern die Rückstände aus ihnen, welche nach Komplementwirkung übrig bleiben, verhalten. Denn im Tierkörper handelt es sich ja nicht um eine einfache Abgabe gebundenen Immunkörpers; dieser hat vielmehr, ehe er abgegeben wird, eine Funktion mit Hilfe des Komplementes erfüllt, die Granulabildung. Ist diese nun Vorbedingung des Freiwerdens der Immunkörper, oder gehört dazu noch etwas anderes? Diese Fragen lassen sich allerdings durch Tierversuche nur sehr unvollkommen beantworten, das Reagenzglasexperiment ist dazu mehr geeignet; doch sollen einige Versuche über diesen Gegenstand angeführt werden.

Zur eigenen Orientierung wurde zunächst geprüft, wie sich die Aktivität eines Immunserums bei der Bakteriolyse innerhalb und außerhalb des Tierkörpers ändert, wobei als Maßstab der Aktivität die Agglutination diene.

Versuch X. Eine Agarkultur Cholera wird in 4 ccm einer Immunserumverdünnung 1:20 aufgeschwemmt, unter vollkommener Agglutination  $\frac{3}{4}$  h bei 40° gehalten, zentrifugiert und der Bodensatz, in zwei Hälften geteilt, sorgfältig gewaschen. Die eine Hälfte erhält ein Meerschweinchen ip. Nach  $\frac{1}{2}$  h wird das Tier, in dessen Bauchhöhle nur noch sehr verminderte Granula zu finden sind, verblutet. Es lassen sich 0,6 ccm Bauchhöhlenflüssigkeit gewinnen. Mit dieser wird Spülwasser, das zu je 0,5 ccm in die Bauchhöhle gebracht und wieder aufgesaugt wurde, vereinigt, so daß die gesamte Flüssigkeitsmenge 2 ccm beträgt. Beim Zentrifugieren ergibt sich ein sehr geringer Satz, der aus wenigen Zellen und spärlichen Granula besteht. — Die andere Hälfte des Satzes aus sensibilisierten Vibrionen wird in 0,5 ccm NaCl-Lösung verteilt, 1,5 ccm aktiven, 2 h alten Meerschweinchen-serums zugesetzt und  $\frac{1}{2}$  h bei 37° gehalten. Gleichzeitig mit dem Verbluten des oben erwähnten Meerschweinchens wird die Probe zentrifugiert; im Satze finden sich ausschließlich Granula. Zum Agglutinationsversuche kommen somit a) Immunserumverdünnung nach Sensibilisierung der Vibrionenhälfte a, b) ebenso von der Hälfte b, c) unveränderte Immunserumverdünnung als Kontrolle, d) Meerschweinchenexsudat aus der Bauchhöhle, e) Meerschweinchen serum nach Auflösung der sensibilisierten Vibrionen, f) das gleiche, aber unveränderte Meerschweinchen serum als Kontrolle.

Menge der Flüssigkeit	a	b	c	d	e	f
0,2 ccm	vollständig	vollst.	vollst.	+ ?	vollst.	vollst.
0,14 "	"	"	"	0	"	"
0,08 "	++	++	"	0	++	+
0,01 "	0	0	"	0	++	0

In der Probe c war noch bei 0,004 ccm, entsprechend 0,0004 ccm Immuns-  
serum, fast vollständige Agglutination eingetreten.

Der Versuch ist an sich höchst interessant; er zeigt, daß durch die erfolgte Bakteriolyse die an die Vibrionen geketteten agglutinativen Komponente der Immuns-  
erumwirkung anscheinend völlig verloren geht, und zwar sowohl im Tierkörper (über-  
einstimmend mit den oben mitgeteilten Versuchen II und III) als im Reagenzglas; denn der Unterschied der Proben e und f ist nicht sehr bedeutend. Das Verschwinden ist aber nur scheinbar, weil spätere in anderer Form angestellte Versuche zeigten, daß unter solchen Umständen nur die dem Kom-  
plement entsprechenden Komponente des komplex zusammen-  
gesetzten Agglutinins verloren geht und sich durch normales Serum ergänzen läßt. Aber über das Verhalten bei der Bak-  
teriolyse gibt eine Untersuchung der Agglutination überhaupt nur wenig Aufschluß.

Es wurde nun festgestellt, ob auch die Rückstände nach einer Bakteriolyse von sensibilisierten Vibrionen außerhalb des Tierkörpers noch schützende Eigenschaften zeigen oder ob die Immunkörper durch den Vorgang der Granulabildung selbst in Freiheit gesetzt werden, dabei in die umgebende Flüssig-  
keit übergehen und sich mit ihr entfernen lassen.

Versuch XI. Zu einer in 0,5 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmten halben Choleraagarkultur wurde 1,9 ccm aktives, ganz frisches Meer-  
schweinchenserum und 0,1 ccm Immuns-  
erum zugesetzt. Innerhalb  $\frac{1}{2}$  h trat bei 40° so gut wie vollständige Granulabildung ein. Eine in ganz gleicher Weise hergestellte Probe ohne Vibrionen diente als Kontrolle. Der aus Granula bestehende Satz wurde nach sorgfältiger Waschung einem Meer-  
schweinchen ip. injiziert. Schon nach  $\frac{1}{4}$  h waren nur noch wenige Granula im Exsudate aufzufinden. Nach 20' wurde  $\frac{1}{6}$  Agarkultur frischer Vibrionen injiziert.  $\frac{1}{4}$  h später war schon  $\frac{1}{3}$  der Vibrionen zu Granula geworden, nach  $\frac{1}{2}$  h der weitaus größte Teil. Nach  $\frac{3}{4}$  h waren überhaupt nur noch Granula zu finden, nach 1 h verminderte sich bereits ihre Zahl. Das Tier überlebte. Die Agglutinationsprüfung ergab bei der von den Granula ab-  
gegossenen Flüssigkeit vollständige Agglutination bis zu 0,1 ccm, unvoll-  
ständige bis zu 0,025 ccm (entsprechend 0,004 bis 0,001 ccm ursprünglichen Immuns-  
erums); die Kontrollprobe agglutinierte bis 0,01715 ccm vollständig, bis zu 0,01 ccm fast vollständig (= 0,0007 und 0,0004 ccm Immuns-  
erum).



Versuch XII. Es werden folgende Versuchsproben angesetzt:

- a)  $\frac{1}{2}$  Kultur Cholera in 0,4 ccm NaCl-Lösung + 1,5 ccm akt. Meerschweinchenserum + 0,1 ccm Immunserum.
- b)  $\frac{1}{2}$  Kultur Cholera in 0,4 ccm NaCl-Lösung + 1,5 ccm  $\frac{1}{2}$ h 60° Meerschweinchenserum + 0,1 ccm Immunserum.

Die Proben c und d enthalten die gleichen Mischungen ohne Vibrionen, dazu kommen noch entsprechend verdünnte Proben mit aktivem und inaktivem Meerschweinchenserum allein. Während  $\frac{3}{4}$ h Aufenthaltes bei 40° haben sich in a lauter Granula gebildet, in b finden sich nur stark agglutinierte Vibrionen. Ein Meerschweinchen erhält den sorgfältig gewaschenen Satz von a ip. und  $\frac{1}{4}$ h später  $\frac{1}{8}$  Kultur lebender Vibrionen. Die sofortige Exsudatentnahme liefert massenhaft Vibrionen und nur ganz spärliche Granula. Nach  $\frac{1}{2}$ h sind massenhaft Granula, gut der Hälfte der Vibrionen entsprechend vorhanden, nach  $\frac{3}{4}$ h sind Vibrionen bereits recht selten, nach  $\frac{7}{8}$ h finden sich nur sehr an Zahl verminderte Granula. Nach 8h sind im eitrigen Exsudate des kranken Tieres weder Granula noch Vibrionen vorhanden. Die Symptome der Cholera Vergiftung werden immer stärker, und das Tier stirbt in der Nacht. Das Exsudat in der Bauchhöhle ist steril, in Netzausstrichen finden sich einzelne Granula. — Ein anderes Meerschweinchen erhält den Satz von b und  $\frac{1}{4}$ h später ebenfalls  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera ip. Der Verlauf der ip. Reaktion ist zunächst der gleiche. Bei der Entnahme nach  $\frac{3}{4}$ h erfolgt aber unglücklicherweise eine Darmverletzung mit Austritt in die Bauchhöhle. Bis ca. 5h nach der Injektion enthält das Exsudat wohl fremde Bakterien, besonders Kokken, aber keine Vibrionen. Um diese Zeit treten solche wieder auf und vermehren sich jetzt sehr rasch. Das Tier stirbt in der Nacht, hat eitriges Exsudat mit viel Vibrionen, überall Eiterauflagerungen. Die sekundäre Infektion scheint ganz verschwunden zu sein, hat aber einer nach dem Befunde leichten Vibrioneninfektion Platz gemacht.

Weitere, später mitzuteilende Befunde beweisen das gleiche, daß nämlich auch die Vibrionenrückstände nach einer Vibriolyse außerhalb des Tierkörpers genug Immunkörper an sich festhalten, die sie dann in der Meerschweinchenbauchhöhle für neue Wirkung abgeben können. Ob quantitative Unterschiede in der Menge der von einfach sensibilisierten Vibrionen und von Rückständen solcher festgehaltenen und nachher abgespaltenen Immunkörper bestehen, wird sich durch den Tierversuch wohl nur schwer, mit unverhältnismäßigen Tieropfern entscheiden lassen. Die Untersuchung der agglutinativen Wirkung der abzentrifugierten Flüssigkeiten, welche genau durchgeführt wurde, kann nach den obigen Darlegungen nicht viel Aufschlüsse geben.

Sie zeigte, daß die Flüssigkeit in a bis 0,1 ccm fast vollständig, bis 0,06 ccm noch eben merkbar agglutinierte (entsprechend 0,005 und 0,003 ccm

Immunserum); die von b agglutinierte mit 0,1 ccm (= 0,005 ccm Immunserum) gerade noch deutlich. Die beiden Kontrollproben wirkten bis zu der 0,0008 ccm entsprechende Menge Immunserum noch fast vollständig, bis 0,0004 ccm noch deutlich. Entsprechend verdünntes Meerschweinchen-serum allein wirkte in der Menge von 0,15 ccm weder im aktiven noch im inaktiven Zustande.

Jedenfalls läßt sich aussagen, daß die erfolgende Bakteriolyse es nicht ist, welche die Immunkörper in Freiheit setzt, mit anderen Worten, die Immunkörper werden nicht oder doch nicht allein deshalb frei, weil der *Vibrio* seine Gestalt unter der Einwirkung des Komplementes so tiefgehend verändert. Die Rückstände nach der Bakteriolyse, über deren Beschaffenheit weiter unten noch einiges zu sagen ist, halten mindestens einen großen Teil des Immunkörpers fest und geben ihn erst im Tierkörper ab.

Versuche mit dem Cholera Stamm 74 verliefen genau so wie die mit Cholera Pfeiffer, nur daß die Giftigkeit dieses Stammes sehr deutlich zum Ausdruck kam.

Versuch XIII.  $\frac{1}{4}$  Kultur Cholera 74 in 0,9 ccm NaCl-Lösung erhält einen Zusatz von 0,1 ccm Immunserum (hergestellt mittels Cholera Pfeiffer, wie alle überhaupt benutzten Sera). Der während  $\frac{1}{2}$  h Aufenthaltes bei 40° stark agglutinierte Satz wird sorgfältig gewaschen und einem Meerschweinchen ip. injiziert. Schon nach  $\frac{1}{4}$  h sind bei der Kapillarentnahme nur wenige und zweifelhafte Granula mehr zu finden.  $\frac{1}{2}$  h nach der ersten Injektion wird  $\frac{1}{12}$  Kultur normaler, lebender Cholera 74 eingespritzt. Die massenhaften Vibrionen sind schon nach  $\frac{1}{4}$  h zu neun Zehnteln in Granula verwandelt. Nach  $\frac{1}{2}$  h hat sich die Zahl der Granula bereits sehr vermindert. Das Tier zeigt aber bald das Symptomenbild der Choleravergiftung, der es in der Nacht mit sterilem Exsudate erliegt. Auf Netzausstrichen finden sich Granula mit Vibrionen gemischt.

Ein Kontrolltier, das als erste Injektion NaCl-Lösung und  $\frac{1}{2}$  h später auch  $\frac{1}{12}$  Kultur erhalten hatte, starb unter typischem Infektionsverlaufe mit stärkster Vibrionenvermehrung. Die Agglutinationsprüfung des mit Vibrionen behandelten Immunserums ergab noch starke Agglutination bei der 0,006, eben merkbare bei der 0,004 ccm Immunserum entsprechenden Menge. Eine in gleicher Weise hergestellte Verdünnung ohne Vibrionen agglutinierte bis 0,0008 ccm Immunsera sehr stark, bis 0,0004 ccm spurenweise.

Versuch XIV. Es wurden folgende Versuchsproben angesetzt:

- a)  $\frac{1}{12}$  Kultur 74 in 0,4 ccm NaCl-Lösung + 1,5 ccm aktives Meerschweinchen-serum + 0,1 ccm Immunserum.
- b)  $\frac{1}{12}$  Kultur 74 in 0,4 ccm NaCl-Lösung + 1,5 ccm Meerschweinchen-serum  $\frac{1}{2}$  h 60° + 0,1 ccm Immunserum.

Dazu entsprechende Proben c und d ohne Vibrionen.

Nach  $\frac{1}{2}$  h Aufenthalt bei  $40^{\circ}$  finden sich in a fast nur Granulahaufen. Die Sätze werden zentrifugiert und gewaschen. Ein Meerschweinchen, das den Satz von a ip. erhielt, zeigte nach 20' im Exsudate keinen sicheren Befund von Granula mehr, ein anderes, das den Satz von b erhalten hatte, wies bereits  $\frac{1}{2}$  h später nur sehr verminderte Granula auf. Jetzt wurde beiden Tieren je  $\frac{1}{2}$  Oese lebender Cholera 74 injiziert, die binnen 10' zu Granula verwandelt war. Beide Tiere zeigten Choleravergiftung, überstanden sie aber nach längerem Siechtum.

Statt des Immunkörpers aus künstlich (vom Kaninchen) gewonnenem Immunserum kann man sich zu diesen Versuchen auch des natürlichen Immunkörpers bedienen, wie er im Serum verschiedener Tiere, am reichlichsten vielleicht im normalen Rinderserum vorkommt. Gerade auf diese Versuche wurde im weiteren Verlaufe der Arbeit das größte Gewicht gelegt, da es möglich erscheint, daraus Schlüsse auf die Bildung der Immunkörper zu ziehen. Denn bei der Immunisierung eines Tieres, welche mit kleinen und kleinsten Bakterienmengen anfängt, treten ja die normalen Immunkörper mit der Bakterien-substanz in Reaktion.

Versuch XV. Je  $\frac{1}{2}$  Kultur Cholera wird mit je 5 ccm aktiven und inaktiven Rinderserums ca. 1 h bei  $40^{\circ}$  behandelt. Agglutination tritt in beiden Proben vollständig, aber im aktiven Rinderserum ungleich schneller und massiger ein. Schon nach  $\frac{1}{2}$  h sind daselbst fast alle Vibrionen in Granula umgewandelt. Die Proben werden zentrifugiert und die Sätze gewaschen. Ein Meerschweinchen, das den Rückstand nach aktivem Rinderserum erhielt, zeigte schon nach  $\frac{1}{4}$  h nur einzelne Granula mehr in der Bauchhöhle. Ein anderes löste die mit inaktivem Rinderserum behandelten Vibrionen zwar fast sofort auf, hatte aber nach  $\frac{3}{4}$  h, wo beiden Tieren je  $\frac{1}{6}$  Kultur lebender Vibrionen injiziert wurde, noch reichlich Granula. Beim ersten Tiere fanden sich  $\frac{1}{4}$  h nach der zweiten Injektion ca.  $\frac{1}{10}$  Granula, nach  $\frac{1}{3}$  h stieg die Zahl schnell an, nach 1 h überwog die Zahl der Granula die spärlichen, schlecht aussehenden Vibrionen weitaus. Nach 4 h waren weder Granula noch Vibrionen im drüseneitigen Exsudate zu finden, das Tier überlebte. Beim anderen Tiere verlief der Versuch analog, doch war die vollständige Granulabildung schon früher, bereits nach 1 h eingetreten. — Die Agglutinationsprüfung ergab, daß das mit Vibrionen behandelte sonst aktiv belassene (nicht erhitzte) Rinderserum bis 0,1 ccm vollständig, mit 0,05 ccm nur schwach agglutinierte. Beim Kontrollserum trat noch bei 0,05 ccm vollständige Agglutination ein. Das im inaktiven Zustande mit Vibrionen behandelte Serum agglutinierte mit 0,2 ccm nur noch spurenweise, aber auch das unbehandelte Kontrollserum war schwächer als im aktiven Zustande, da es erst mit 0,1 ccm vollständige, mit 0,05 ccm nur schwache Agglutination hervorrief.

Versuch XVI. Es wurden folgende Proben hergestellt:

- a)  $\frac{1}{10}$  Kultur Cholera 74 in 0,5 ccm NaCl-Lösung + 5 ccm aktiven Rinderserum.
- b)  $\frac{1}{10}$  Kultur Cholera 74 in 0,5 ccm NaCl-Lösung + 5 ccm Rinderserum  $\frac{1}{8}$  h 60",  
sowie die entsprechende Kontrolle c und d ohne Vibrionen.

Während eines 1<sup>h</sup> Aufenthaltes bei 40° erfolgte Agglutination, mit vollkommener Granulabildung in a. Die Proben werden zentrifugiert und die Sätze gewaschen. Ein Meerschweinchen, das den Satz von a ip. erhielt, wies schon  $\frac{1}{4}$  h später keinen deutlichen Befund im Exsudate mehr auf. Nach  $\frac{1}{2}$  h erhielt es  $\frac{1}{18}$  Kultur lebender Cholera 74 ip. Nach  $\frac{1}{4}$  h finden sich vereinzelte Granula neben viel Vibrionen, nach  $\frac{1}{2}$  h beträgt die Menge der Granula ca.  $\frac{1}{4}$  der Vibrionen, nach  $\frac{3}{8}$  h sind die Granula neben spärlichen, gequollenen Vibrionen in Uebersahl, nach 1  $\frac{1}{2}$  h finden sich nur noch sehr selten gequollene Vibrionen, und auch die Zahl der Granula ist bereits sehr vermindert. Nach 3 h finden sich weder Granula noch Vibrionen im Exsudate des kranken Tieres, das der Choleravergiftung in der Nacht erliegt, gleichzeitig mit dem anderen Meerschweinchen, welches die mit inaktivem Serum behandelten Vibrionen erhalten hatte, welche fast augenblicklich in Granula verwandelt wurden. Die Bakteriolyse der nach  $\frac{1}{2}$  h eingespritzten  $\frac{1}{18}$  Kultur lebender Cholera 74 verlief deutlich schneller, da schon nach  $\frac{1}{4}$  h der größere Teil der Vibrionen zu Granula geworden war und sich nach  $\frac{1}{2}$  h nur noch solche vorfanden, um nach 1 h an Zahl bereits sehr abzunehmen. — Die Agglutinationsprüfung zeigte, daß das Rinderserum vor der Vibrionenbehandlung mit 0,05 ccm vollständig, mit 0,02 ccm schwach agglutinierte. Nach der Vibrionenbehandlung waren die entsprechenden Werte 0,2 und 0,1—0,05 ccm. (Bei der letzten Menge eine schwer wahrnehmbare Spur.) Das inaktive Serum agglutinierte vor der Vibrionenbehandlung mit 0,5 ccm stark, aber nicht vollständig, nachher mit 0,5 ccm nur noch spurenweise.

Die Uebereinstimmung des normalen Rinderimmunkörpers mit dem immunisatorisch gewonnenen künstlichen Ambozeptor ist eine vollkommene. Allerdings scheint es, als ob die Vibrionenrückstände nach einer außerhalb des Tierkörpers erfolgten Bakteriolyse schwächer wirkten, als einfache sensibilisierte Vibrionen; denn in der Meerschweinchenbauchhöhle bewirkte erstere langsamer als die letztere Granulabildung. Doch ist der Unterschied nur ein quantitativer.

Von Interesse mußte es nun sein, festzustellen, wie sich die von sensibilisierten Vibrionen im Tierkörper abgespaltenen Rinderimmunkörper verhalten. Denn das normale Rinderserum vermag bekanntlich verschiedene Bakterien, z. B. choleraähnliche so gut wie echte Choleravibrionen, wirksam

zu sensibilisieren. Wie verhalten sich in diesem Falle die von den Bakterien abgespaltenen Rinderimmunkörper?

Versuch XVII. Je  $\frac{2}{5}$  Agarkultur von Cholera Pfeiffer und Vibrio XI werden mit je 8 ccm inaktivem Rinderserum (56°)  $\frac{2}{4}$  h bei 72° gehalten, zentrifugiert und die gewaschenen Bodensätze 2 Meerschweinchen ip. injiziert. Das Tier, welches Cholera erhalten hatte, zeigte nach  $\frac{1}{4}$  h im Exsudat fast nur Granula, nach  $\frac{2}{4}$  h war auch die Zahl dieser sehr stark gesunken. Jetzt wurde  $\frac{1}{5}$  Kultur lebender Cholera injiziert.  $\frac{1}{4}$  h später war ca. der zehnte Teil,  $\frac{1}{2}$  h später gut  $\frac{2}{3}$  der Vibrionen in Granula verwandelt, nach 1 h war die Reaktion beendet. Das Tier zeigte schwere Symptome der Choleravergiftung und starb nach 24 h mit sterilem Bauchhöhlenexsudate; auch auf Netzausstrichen fanden sich weder Vibrionen noch Granula. Ungleich langsamer lief die Bakteriolyse der sensibilisierten XI-Vibrionen ab. 1 h nach der Injektion waren massenhaft Granula und auch noch sehr gequollene Vibrionen übrig. Die Einspritzung von  $\frac{1}{5}$  Kultur Cholera um diese Zeit führte zu einer fortschreitenden Vibrionenvermehrung, welche das Tier in der Nacht tötete.

Versuch XVIIa. Je  $\frac{1}{5}$  Agarkultur von Vibrio El Tor und Vibrio 6 wurde mit je 10 ccm inaktivem Rinderserum 1 h bei 42° sensibilisiert und hierauf die gewaschenen Bakterien 2 Meerschweinchen ip. injiziert. Innerhalb von 3 h war die Bakteriolyse völlig abgelaufen und auch Granula waren bereits spärlich geworden. Jetzt wurde beiden Tieren je  $\frac{1}{5}$  Agarkultur Cholera injiziert. Bei dem Meerschweinchen, welches früher den Vibrio 6 erhalten hatte, trat fortschreitende Vermehrung und Tod an Infektion in der Nacht ein. Das andere Tier, welches bereits zur Zeit der Cholerainjektion deutliche Symptome der Vergiftung durch El Tor-Vibrionen zeigte, ließ die Bakteriolyse binnen  $\frac{1}{2}$  h ablaufen, starb aber ebenfalls in der Nacht mit ganz spärlichem Befunde von Granula im Exsudate, ziemlich reichlichem Vorkommen von Vibrionen und Granula im Netzausstriche.

Versuch XVIII. Je  $\frac{1}{4}$  Agarkultur von Cholera Pfeiffer, Vibrio 6 und Massanah wurde mit je 8 ccm inaktiven (56°) Rinderserum 1 h bei 42° sensibilisiert. Die gewaschenen Vibrionen werden 3 Meerschweinchen ip. injiziert. Bei allen sind nach  $\frac{2}{4}$  h bei abgelaufener Bakteriolyse die Granula schon recht spärlich geworden. Jetzt erfolgte die Injektion von  $\frac{1}{7}$  Kultur Cholera Pfeiffer. Im Choleratiere lief die Bakteriolyse innerhalb 1 h ab, das Tier lebte mit sterilem Exsudate bis zum nächsten Tage, starb aber dann an Intoxikation. Das Bauchhöhlenexsudat war steril, auch Netzausstriche ließen nur noch ganz selten Vibrionen und Granula erkennen. Das Tier, das Vibrio Massanah erhalten hatte, ergab fortschreitende Vermehrung und Tod an Infektion in der Nacht. Bei dem Tiere, das Vibrio 6 erhalten hatte, erfolgte anfangs ziemlich gute Granulabildung und Abnahme der Vibrionen, die sich aber später wieder vermehrten. Der Tod trat in der Nacht ein. Im Peritoneum fanden sich ca. 4 ccm trüben Exsudates, das zahlreiche Vibrionen enthielt, die aber nicht so reichlich wie sonst waren. Ausstriche von Netz und Peritoneum parietale zeigten aber ungeheure Mengen von Vibrionen.

Die Versuche sprechen somit für eine ganz unzweideutige dabei aber doch keineswegs absolute Spezifität der Wirkung der im Tierkörper von den sensibilisierten Vibrionen abgesprengten Immunkörper des normalen Rinderserums. Sie schützen im wesentlichen und vollständig nur gegen Cholera-vibrionen, wenn sie vorher an solche gebunden waren, nicht aber, wenn sie an nahe verwandte Vibrionenarten außerhalb des Tierkörpers gekettet wurden. Genauer über dieses Verhalten wurde später, bei Gelegenheit von Reagenzglasversuchen ermittelt.

Da die Rückstände nach einer Behandlung von Vibrionen mit aktivem Rinderserum noch bakteriolytische Effekte auslösen können, so mußte es naheliegen, zu untersuchen, ob nicht auch das Produkt der Einwirkung von Rinderserum auf gelöste Vibrionensubstanz (Choleraextrakte), also Cholera-präzipitate, im Tierkörper bakteriolytische Immunkörper abgebe. Denn nach den Versuchen von Bail und Hoke mit Rinderserum läßt sich annehmen, daß bakteriolytische und präzipitierende Serumwirkungen in einem sehr nahen Zusammenhang stehen. Die von den genannten Autoren vertretene Auffassung geht dahin, daß im Serum überhaupt nur eine einheitliche Wirkung auf Bakterien und Bakteriensubstanz ausgeübt werde, welche aber je nach den Bedingungen der Reaktion eine verschiedene Form, als Agglutination, Bakteriolyse und Präzipitation annimmt. Für diese Anschauung mußte es eine gewichtige Stütze werden, wenn sich zeigen ließ, daß Präzipitate, also die Reaktionsprodukte gelöster Bakteriensubstanz mit den sonst als selbständig angenommenen Serumpräzipitinen, bakteriolytische Immunkörper freimachen können. Die Versuche gelangen ohne Schwierigkeit sowohl mit Präzipitaten aus Immunserum, wie mit solchen aus Rinderserum. Letzteres wurde dabei stets im aktiven Zustande verwendet, da bereits eine  $\frac{1}{2}$ h Erhitzung auf 56—60° eine zu starke Herabsetzung, wenn auch noch keine Aufhebung der präzipitierenden Kraft des Serums herbeiführt. Die Extrakte wurden in der später angegebenen Weise gewonnen.

Versuch XIX. 1,5 cem Choleraextrakt wird mit 1 cem einer Immunserumverdünnung 1:10 gefällt, der Niederschlag sorgfältig abzentrifugiert, gewaschen und einem Meerschweinchen injiziert. 40' später erhält das Tier

$\frac{3}{10}$  Kultur normaler lebender Vibrionen. Schon nach 10' ist ca. der dritte Teil der Vibrionen in Körnchen verwandelt, nach  $\frac{1}{2}$  h ist die Granulabildung vollkommen, 3 h später finden sich weder Granula noch Vibrionen mehr. Das Tier übersteht die nach 5 h sehr deutliche Choleravergiftung ohne Mühe. — Die Agglutinationsprüfung des ausgefällten Serums ergab noch fast vollständige Agglutination bei der 0,005 ccm ursprünglichen Immunserums entsprechenden Menge, keine mehr bei 0,001 ccm, während eine Kontrollverdünnung bei dieser Menge und noch weit darunter völlig agglutinierte.

Versuch XX. Es werden folgende Proben angesetzt:

- 1) 0,75 ccm Choleraextrakt + 0,15 cmm Immunserum + 2,25 ccm NaCl-Lösung.
- 2) 3 ccm Choleraextrakt + 0,15 ccm Immunserum + 0 NaCl-Lösung.
- 3) 0 Choleraextrakt + 0,15 ccm Immunserum + 3 ccm NaCl-Lösung.

Während eines ca. 1 h Aufenthaltes bei 40° erfolgt in 1 und 2 Ausflockung. Die Präzipitate werden sorgfältig gewaschen. Das Meerschweinchen, das den Satz von 1) und  $\frac{1}{2}$  h später  $\frac{1}{6}$  Kultur Cholera erhielt, zeigte nach  $\frac{1}{4}$  h erst wenige, nach  $\frac{1}{2}$  h ca. die Hälfte Granula. In diesem Verhältnis blieb es bis nach 1  $\frac{1}{2}$  h, wo rasche Beendigung der Reaktion erfolgte. Das andere Tier mit dem Satz von 2) verhielt sich ziemlich ebenso. Beide Tiere überlebten. Die Agglutinationsprüfung ergab bei der Flüssigkeit von 1) vollständige Agglutination bis zu der 0,005 ccm entsprechenden Menge Immunserum, bei 2) bis zu 0,01 ccm, bei 3) bis zu 0,0005 ccm.

Versuch XXI. 5 ccm Choleraextrakt werden mit 4 ccm Immunserum 1:10 gefällt, der Satz in zwei Teile geteilt und sorgfältig gewaschen. Ein Meerschweinchen erhielt den einen Teil und  $\frac{1}{2}$  h später  $\frac{1}{4}$  Agarkultur von Cholera. Nach  $\frac{1}{4}$  h sind nur sehr wenige Granula, aber sehr viele Vibrionen, oft in dichten Häufchen, zu finden. Nach  $\frac{1}{2}$  h beträgt die Zahl der Granula etwa den vierten Teil der noch zahlreichen Vibrionen. Nach  $\frac{3}{4}$  h überwiegt die Zahl die Granula, ebenso nach 1  $\frac{1}{2}$  h, wo die noch vorhandenen Vibrionen fast nur in Häufchen lagen. Nach 4 h sind noch vereinzelte Vibrionen und Granula bei mäßiger Leukocytose zu finden. Das Tier wird krank, überlebt aber. Ein anderes Meerschweinchen erhält den Satz und gleichzeitig  $\frac{1}{4}$  Kultur Cholera ip.  $\frac{1}{2}$  h später finden sich massenhafte Granula, neben ca.  $\frac{1}{6}$  Vibrionen. Nach 1 h ist das Bild ungefähr gleich, nach  $\frac{5}{4}$  h scheinen die Vibrionen etwas zugenommen zu haben, nach 2 h finden sich relativ wenige Granula, bei deutlich vermehrten Vibrionen, nach 4 h finden sich noch häufig, aber nicht übermäßig zahlreiche Vibrionen, dabei Leukocytose mit intensiver Phagocytose. Am nächsten Tage enthält die Bauchhöhle des kranken Tieres nur dünnen sterilen Eiter. Es überlebt.

Die Agglutinationsprüfung ergibt eine Verminderung der Agglutination von 0,01—0,005 ccm, gegenüber 0,0005 ccm der Kontrolle.

Versuch XXII. Je 5 ccm Choleraextrakt werden mit je 2,5 ccm einer Immunserumverdünnung 1:10 ausgefällt, die Präzipitate sorgfältig gewaschen. Ein Meerschweinchen erhält zuerst Präzipitat, nach  $\frac{3}{4}$  h  $\frac{1}{2}$

Kultur Cholera ip. Eine unmittelbar darauf durchgeführte Exsudatentnahme ergibt massenhaft Vibrionen, die fast alle in Häufchen liegen. Nach  $\frac{1}{4}$  h haben sie sich bei relativ geringer Granulabildung vermindert. Nach  $\frac{1}{2}$  h ist die Verminderung der Vibrionen noch auffallender, die Zahl der Granula ist gestiegen; nach  $\frac{3}{4}$  h vermehrt sich die Menge der Granula. Nach  $\frac{5}{4}$  h ist eine weitere Verminderung bei ungefähr gleicher Zahl der Vibrionen und Granula festzustellen. Nach 4 h enthält das Exsudat neben zahlreichen Granula noch sehr viel, anscheinend vermehrte Vibrionen; es besteht Leukocytose mit starker Phagocytose. Nach 6 h ist die Vibrionenzahl sehr stark vermindert, neben viel weniger Granula. Es besteht mäßige Leukocytose und Phagocytose. Das Tier ist sehr krank und stirbt nach 28 h. Die Bauchhöhle enthält zähes Exsudat mit viel Leukocyten, welche öfters Granulaphagocytose zeigen. Im freien Exsudate finden sich weder Granula noch Vibrionen. Ausstriche des Eiters vom Netz zeigen Leukocyten mit Granulaphagocytose und einzelne Vibrionen. — Ein anderes Meerschweinchen, das Präzipitat und  $\frac{1}{6}$  Kultur Cholera gleichzeitig erhält, zeigt nach  $\frac{1}{4}$  h nur wenige Granula neben zahlreichen Vibrionen. Nach  $\frac{1}{2}$  h ist eine allgemeine Verminderung der Bakterien eingetreten; die Granula und Vibrionen finden sich in ungefähr gleicher Zahl. Das Bild bleibt ungefähr gleich, bis nach  $\frac{3}{4}$  h bei reichlichem Vorkommen von Granula auch die Vibrionen vermehrt erscheinen. Die späteren Entnahmen liefern fortgesetzt reichliche Granulabildung bei zahlreichen Vibrionen, erst nach 6 h sinkt die Zahl derselben, immer unter Granulabildung, doch so, daß auch jetzt noch etwas mehr Vibrionen als Granula vorhanden sind. Es besteht mäßige Leukocytose mit wenig ausgesprochener Granulaphagocytose. Das sehr kranke Tier erholt sich schließlich.

Versuch XXIII. 2,5 ccm Choleraextrakt werden mit 5 ccm aktivem Rinderserum gefällt, das reichliche Präzipitat wird gewaschen und einem Meerschweinchen ip. injiziert.  $\frac{3}{4}$  h später wird  $\frac{1}{6}$  Kultur Cholera eingespritzt. Schon  $\frac{1}{4}$  h später finden sich reichlich Granula neben viel Vibrionen, nach  $\frac{1}{2}$  h macht die Zahl der noch erhaltenen Vibrionen höchstens  $\frac{1}{6}$  der vorhandenen Granula aus, nach 1 und  $1\frac{1}{2}$  h finden sich nur noch spärlich Vibrionen neben massenhaften Körnchen. Nach 5 h sind im dünneiterigen Exsudat weder Granula noch Vibrionen zu finden. Das Tier überlebt. — Die Agglutinationsprüfung ergab, daß das ausgefällte Serum in der 0,1 ccm entsprechenden Menge reinen Rinderserums noch vollständig, bei 0,05 ccm spurenweise agglutinierte. Eine Kontrollprobe lieferte die Zahlen 0,05 und 0,02 ccm.

Versuch XXIV. Je 5 ccm Choleraextrakt werden mit 10 ccm aktivem Rinderserum und 5 ccm Immunserumverdünnung 1:10 gefällt und die Präzipitate gewaschen.

Ein Meerschweinchen erhält das Rinderserumpräzipitat und  $\frac{1}{2}$  h später  $\frac{1}{6}$  Kultur Cholera ip. Nach  $\frac{1}{4}$  h fanden sich noch wenige Granula, nach  $\frac{1}{2}$  h betrug ihre Menge ca.  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  der vorhandenen Vibrionen, nach  $\frac{3}{4}$  h erwies sich die Gesamtmenge von Bakterien vermindert, wobei jedoch noch immer die erhaltenen Vibrionen reichlicher als die Granula vorhanden waren.



nach 1<sup>h</sup> waren Granula und Vibrionen an Zahl gleich, nach  $\frac{3}{4}$  und besonders nach 1 $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> waren bei reichlich vorhandenen Granula nur noch so spärliche Vibrionen übrig, daß der Prozeß als abgelaufen gelten konnte. Das Tier überlebte, ebenso wie ein anderes Meerschweinchen, welches das Immunserumpräzipitat und  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> später  $\frac{1}{8}$  Cholerakultur erhalten hatte. Bei diesem war aber schon nach  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> die Zahl der Granula überwiegend und nach  $\frac{3}{4}$ <sup>h</sup> die Bakteriolyse abgelaufen.

Versuch XXV. Je 5 ccm Choleraextrakt wurden mit 10 ccm Rinderserum und 5 ccm Immunserumverdünnung 0,2 + 4,8 ccm NaCl-Lösung gefällt. Die gewaschenen Präzipitate wurden 2 Meerschweinchen und  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> später je  $\frac{1}{8}$  Cholerakultur injiziert. Das Tier mit Rinderserumpräzipitat zeigte nach  $\frac{1}{4}$ <sup>h</sup> erst wenige, nach  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> reichlichere Granula. Nach  $\frac{3}{4}$  und 1<sup>h</sup> hatte die Bakterienzahl im ganzen abgenommen; was noch vorhanden war, bestand zu ungefähr gleichen Teilen aus Granula und Vibrionen. Nach 1 $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> überwogen die Granula, nach 2<sup>h</sup> waren nur spärliche Vibrionen mehr zu finden, und nach 2 $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> war die Reaktion beendet. Das Tier mit Immunserumpräzipitat zeigte schon nach  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> gleich viele Granula wie Vibrionen, nach  $\frac{3}{4}$ <sup>h</sup> überwogen die ersteren, nach 1 $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> war der Prozeß so gut wie abgelaufen. Beide Tiere überlebten. — Die Agglutinationsprüfung zeigte, daß Rinderserum nach der Präzipitation mit der 0,2 ccm entsprechenden Menge reinen Rinderserums noch vollständig, mit 0,1 ccm noch stark, mit 0,05 ccm spurenweise agglutinierte; ohne Präzipitation mit 0,075 ccm vollständig, mit 0,03 ccm noch stark. Für die Immunserumverdünnung lauteten die betreffenden Zahlen nach erfolgter Präzipitation 0,005 und 0,002 ccm, ohne Präzipitation 0,001 und 0,0005 ccm.

Versuch XXVI. 5 ccm Extrakt von Cholera 74 und ebensoviel von Cholera Pfeiffer werden mit je 5 ccm einer Immunserumverdünnung 1 : 20 gefällt. Die gewaschenen Präzipitate werden 2 Meerschweinchen injiziert, welche  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> später je  $\frac{1}{16}$  Kultur Cholera 74 erhalten. In dem Tiere mit dem Präzipitate von Cholera 74 ist nach  $\frac{1}{4}$ <sup>h</sup> bereits deutliche Granulabildung eingetreten. Nach  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> ist eine starke Bakterienverminderung eingetreten; die Zahl der Granula beträgt etwa  $\frac{1}{8}$  der noch vorhandenen Vibrionen. Nach  $\frac{3}{4}$ <sup>h</sup> kann die Reaktion als beendet gelten, da sich nur noch vereinzelte Vibrionen neben vielen, aber auch bereits sehr verminderten Granula vorfinden. Ganz analog in jeder Hinsicht verlief der Versuch mit dem Meerschweinchen, welches das Präzipitat von Cholera Pfeiffer erhalten hatte. Beide Tiere zeigten bald den Symptomenkomplex der Choleravergiftung, der sie erlagen. Die Bauchhöhlenextrakte waren steril, auf Netzausstrichen fanden sich noch Granula und Vibrionen gemischt.

Versuch XXVII. Je 3,5 ccm Choleraextrakt 74 wurden mit je 0,35 ccm Immunserum unter Zusatz von 1,15 ccm NaCl-Lösung und je 2 ccm aktivem Meerschweinchenserum ausgefällt. Der Zusatz von Meerschweinchenserum wurde gemacht, um die Verhältnisse im Tier nachzunehmen. Die Präzipitate wurden gewaschen und 2 Meerschweinchen ip. injiziert. Das eine Tier erhielt den Satz gleichzeitig mit  $\frac{1}{16}$  Kultur Cholera 74. Schon  $\frac{1}{4}$ <sup>h</sup> später überwog die Zahl der Granula die der er-

haltenen Vibrionen, nach  $\frac{1}{2}$  h waren nur noch Granula zu finden. Bei dem andern Tiere, welches erst  $\frac{1}{3}$  h nach der Injektion des Präzipitates  $\frac{1}{18}$  Kultur Cholera 74 erhielt, verlief der Prozeß analog, war aber erst nach  $\frac{3}{4}$  h beendet. Nach  $2\frac{1}{2}$  h war das Exsudat beider Tiere frei von Granula und Vibrionen. Aber beide Tiere erlagen der Choleravergiftung in der Nacht mit sterilem Exsudate. Das eine hatte wenige, das andere reichliche Vibrionen in Ausstrichen des Netzes. Ein drittes Tier, welches nur  $\frac{1}{18}$  Kultur Cholera 74 als Kontrolle erhalten hatte, starb bereits nach 6 h unter Vibrionenvermehrung. — Die Agglutinationsprüfung ergab, daß die Präzipitation die Agglutination von 0,0006 auf 0,002 cem vermindert hatte.

Versuch XXVIII. 5 cem Choleraextrakt 74 werden mit 10 cem Rinderserum gefällt. Das gewaschene Präzipitat wird einem Meerschweinchen injiziert, das  $\frac{1}{2}$  h später  $\frac{1}{18}$  Kultur Cholera 74 erhält. Nach  $\frac{1}{4}$  h finden sich erst wenige Granula, nach  $\frac{1}{2}$  h ist ihre Zahl bedeutend vermehrt; sie liegen meist in Haufen beisammen. Nach  $\frac{3}{4}$  h hat eine allgemeine Verminderung stattgefunden. Granula, meist in Haufen, sind zahlreich vorhanden, überdies finden sich viele gequollene und spärliche normale Vibrionen. Nach 1 h hat eine weitere allgemeine Verminderung stattgefunden, nach  $1\frac{1}{2}$  h sind nur noch spärlich Granula und gequollene Vibrionen zu sehen. Nach 4 h finden sich nur ganz vereinzelte Granula. Das Tier erliegt der Choleravergiftung mit sterilem Exsudate und mäßig vielen Vibrionen und Granula in Netzausstrichen. Die Agglutinationsprüfung ergab, daß die Agglutination durch die Präzipitation von 0,075 cem auf 0,5 cem vermindert war.

Die Versuche sind zahlreich und etwas ausführlicher wiedergegeben, um einen Einblick in dieses wichtige Verhalten des Cholerapräzipitates zu gewähren. Es unterliegt keinem Zweifel, daß man auch mit Präzipitaten eine Abspaltung von bakteriziden Immunkörpern erzielen, also mit ihnen Tiere vor vielfach tödlichen Mengen von Cholera-vibrionen schützen kann. Was sich mit sensibilisierten Vibrionen erreichen läßt, gelingt auch mit Präzipitaten, und zwar im ganzen in analoger Weise. Im einzelnen fällt allerdings öfters ein etwas abweichender Verlauf der intraperitonealen Bakteriolyse auf, der in den Versuchsprotokollen wiedergegeben ist. Es handelte sich dabei um eine allgemeine Verminderung der Bakterien im Exsudate, ohne daß eine entsprechend starke Granulabildung eingetreten wäre. War z. B. der dritte Teil der Vibrionen in Granula umgewandelt, so blieb nach einiger Zeit dieses relative Mengenverhältnis ungefähr gleich, aber dabei waren sowohl Vibrionen als Granula weniger zahlreich geworden. Das ist ein Verhalten,

dem man bei bakteriolytischen Versuchen mit Typhusbacillen, namentlich mit gewissen Stämmen von solchen, begegnen kann, für Cholera weicht es vom gewöhnlichen Befunde ab. Doch trat in der Regel später volle Granulabildung ein, und jedenfalls ist an einer Abgabe bakteriolytisch wirksamer Stoffe durch Präzipitate nicht zu zweifeln.

Zunächst ist dabei an ein mechanisches Mitreißen bakteriolytischer Immunkörper zu denken, da ja bei Fällungsvorgängen ganz verschiedener Art sonst nicht gut darstellbare Stoffe, wie Toxine und Fermente, aus einer Flüssigkeit entfernt werden können. Durch sorgfältiges Waschen wird aber die schützende Wirkung solcher Präzipitate nicht zerstört, und überdies spricht gegen eine solche Annahme das Ergebnis von Reagenzglasversuchen. Solche lassen sich sehr leicht anstellen, besonders da die große Empfindlichkeit unseres Cholera-stammes Pfeiffer eine sehr bequeme Beobachtungsmethode, die mikroskopische, zuläßt. Die Vibrionen zerfallen nämlich auch außerhalb des Tierkörpers sehr leicht in Granula und reagieren damit sehr fein auf das Vorhandensein von bakteriolytischem Immunkörper. Es genügt daher, die auf ihren Immunkörpergehalt zu prüfende Flüssigkeit in verschiedenen Verdünnungen reichlich mit Vibrionen zu besäen und ein geeignetes Komplement hinzuzusetzen. Als solches kann man Meerschweinchenserum benutzen, das aber selbst schon einen Gehalt an normalen Immunkörpern besitzt und daher an sich Granulabildung erzeugen kann. Namentlich das Serum älterer Tiere ist deshalb ungeeignet, während junge, höchstens 200 g schwere Tiere in der Regel geeignetes Serum liefern. Auch solches muß aber immer in einer Kontrollprobe für sich allein mit Vibrionen zusammengebracht werden; denn einige Granula, die meist in lockeren Haufen beisammenliegen, bilden sich auch darin, stören aber bei einiger Uebung das Ergebnis des Versuches nicht mehr. Gelegentlich kam es allerdings auch vor, daß Serum jüngerer Tiere an sich zu stark wirkte und daß deshalb ein oder der andere Versuch als zweifelhaft beiseite gelassen werden mußte. Als Menge des Serums kam fast stets 0,025 ccm zur Verwendung, die Choleraeinsaat betrug  $\frac{1}{15}$  bis  $\frac{1}{10}$  Oese. Das sind gerade genug Vibrionen, um ein leichtes mikroskopisches Arbeiten zu ermöglichen.

Von sonstigen Versuchsbedingungen ist die Einhaltung einer Temperatur von  $41-42^{\circ}$  hervorzuheben. Nicht deshalb, als ob nicht auch bei  $37^{\circ}$  Granulabildung stattfinden würde; sie erfolgt ganz gut auch bei dieser Temperatur. Aber ca.  $42^{\circ}$  stellt, wie Kikuchi gezeigt hat, das Optimum für bakteriolytische Experimente dar, der von uns verwendete Cholera-stamm wird durch diese Wärme noch nicht geschädigt, und der Versuch kann in sehr kurzer Zeit beendet werden. In der Regel wurden aus den verschiedenen ins Wasserbad eingestellten Proben nach  $\frac{1}{2}-\frac{3}{4}^h$  diejenigen untersucht, bei denen voraussichtlich die stärkste bakteriolytische Wirkung zu erwarten war. War sie eingetreten, d. h. fanden sich im Präzipitate Granula in überwiegender Menge vor, so wurden nach  $1^h$  alle Versuchsproben untersucht und das Ergebnis notiert. Es war nur ganz selten notwendig, die Dauer des Versuches auszudehnen. Es ist selbstverständlich, daß alle diese Verhältnisse, Menge des Komplementes, Größe der Einsaat, Versuchsdauer für jeden einzelnen Stamm durch Erfahrung ausprobt sein müssen; dann läßt sich mit dieser mikroskopischen Methode so sicher und viel bequemer als mit irgendeiner anderen arbeiten. Zu bedauern ist nur, daß sie nicht allgemein anwendbar ist; so erwiesen sich der *Vibrio* 6, ein Wasservibrio, den das Institut der Freundlichkeit von Herrn Prof. Neufeld verdankt, und ähnlich der *Vibrio* Massauah als zu wenig widerstandsfähig, da sie bei jeder anwendbaren Dosis von Meerschweinchenserum allein zu reichlich in Körnchen zerfielen. Umgekehrt wieder sind der *Vibrio* XI, ein von Gruber seinerzeit viel benutzter choleraähnlicher Wasservibrio, der *Vibrio* Elvers, der *Typhusbacillus* allzu sehr resistent. Man müßte bei diesen die Einsaat so klein machen, daß dann eine sichere mikroskopische Beurteilung des Resultates nicht mehr gut möglich ist.

Die mikroskopische Methode hat zweifellos gegenüber der kulturellen Methode der Plattenversuche große Vorteile. Sie gestattet die Frage der stattgefundenen Bakteriolyse nach den morphologischen Gestaltsveränderungen sofort zu beantworten, ohne auf den physiologischen Endeffekt, die Lebensvernichtung, warten zu müssen. Dadurch wird sie unabhängig von der Erscheinung, daß Granulabildung, also der unzweideutige Aus-

druck der stattgehabten Bakteriolyse, nicht gleichbedeutend ist mit dem Absterben der Bakterien. Es ist auffällig, wie viele Kolonien aus einer Versuchsprobe noch herauswachsen können, die nach dem mikroskopischen Bilde ausschließlich Granula enthält, von denen also mindestens ein Teil noch lebensfähig sein muß. Im Tierkörper würden, wie die Erfahrung lehrt, solche Granula schwerlich mehr aufkommen können, auf der Agarplatte sind sie dem Einflusse der Serumaktivität entrückt und liefern Kolonien, welche eine geringere Bakteriolyse vortäuschen können, als tatsächlich besteht.

Selbstverständlich wird man über der mikroskopischen die kulturelle Methode und den Tierversuch, wo sie anwendbar sind, nicht vernachlässigen, und wiederholt wurden alle Methoden nebeneinander angewendet. Da die Ergebnisse übereinstimmten, so konnte die schnellste, leichteste und auch billigste mikroskopische Beobachtung ohne Gefahr bevorzugt werden.

Bei der Uebertragung der Tierversuche auf das Reagenzglasexperiment mußte vor allem die Frage vorgelegt werden, was eigentlich im Meerschweinchenkörper das entscheidende Moment für die Abspaltung des an sensibilisierte Vibrionen gebundenen Immunkörpers sei. Temperaturdifferenzen und Veränderungen des Mediums kommen um so weniger in Betracht, als ja nebeneinander in der gleichen Bauchhöhle Abspaltung des Immunkörpers von den einen und Hinzutritt zu anderen Vibrionen möglich ist. Es wurde daher als Ursache das Vorhandensein des Komplements angenommen; dieses kann nach den Untersuchungen von Bail und Hoke als echtes Ferment angesehen werden, das die sonst nur langsam (Präzipitation) oder unvollständig (Bakteriolyse) zustande kommende Verbindung des den Immunkörper repräsentierenden Serumstoffes mit der gelösten oder geformten Bakteriensubstanz beschleunigt und vervollständigt. Fermente sind aber, wie bekannt, sehr wohl einer entgegengesetzten Wirkungsweise fähig, und wir halten diese Erklärung bis auf weitere Untersuchungen für die im Tierkörper zutreffendste. Sie leitete auch die ersten Reagenzglasversuche; es stellte sich aber bald heraus, daß in solchen auch eine Abspaltung des Immunkörpers ohne Zwischentreten des Komplementes möglich ist.

Versuch XXIX. Je eine Agarkultur von Cholera Pfeiffer wurde 1) in 2 ccm Immunserumverdünnung 1:10, 2) in 10 ccm Rinderserum, das  $\frac{1}{2}$  h auf 60° erhitzt war, 3) in 5 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Alle Proben standen über Nacht bei Zimmertemperatur, wurden dann gründlich zentrifugiert. Die sorgfältig gewaschenen Bodensätze wurden mit je 2 ccm aktiven, ganz frischen Meerschweinchenserums 1 h bei 42° behandelt. Dabei trat in 1) und 2) vollständige Granulabildung ein, die aber auch in 3) eine ziemliche Ausdehnung erreichte. Jetzt wurde zentrifugiert und die obenstehenden Flüssigkeiten: MsJ, MsR, MsN nach  $\frac{1}{2}$  h Erwärmung auf 56° untersucht. Als Kontrolle diente ein ohne Vibrionen belassenes, sonst aber ganz gleich behandeltes Meerschweinchenserum. Die Agglutinationsprüfung ergab, daß 0,5 ccm von MsJ und MsR deutlich, MsN kaum nachweisbar agglutinierte; aber auch das Kontrollserum brachte Flockung in dieser Dosis hervor. Alle niedrigeren Dosen waren wirkungslos.

Der Plattenversuch wurde so angestellt, daß 0,1 ccm normales, aktives Meerschweinchenserum mit verschiedenen Mengen von MsJ, MsR etc. versetzt und nach Einsaat von ca. 150 000 Vibrionen 4 h bei 37° gehalten wurde.

	von MsJ	von MsR	von MsN	von Kontrolle
0,001 ccm	0	7200	22 000	420
0,005 „	0	480	25 000	10 000
0,01 „	0	0	150 000	4800
0,05 „	0	6800	$\infty$	8200

Dieser Versuch ist deshalb wenig brauchbar, weil 0,1 ccm des benutzten Meerschweinchenserums allein fast alle eingesäten Vibrionen abgetötet hatte. Der Zusatz von MsN und der Kontrolle hatte also die Wirkung verschlechtert, was bei MsR nur in geringem Grade, bei MsJ gar nicht eingetreten war. Um so eindeutiger verlief der Tierversuch:

Er wurde doppelt angestellt. Zunächst erhielten von 2 Meerschweinchen das eine 0,5 ccm MsJ, das andere 0,5 ccm MsN gleichzeitig mit einer Oese Cholera ip. Beim ersten Tier waren nach 5' spärliche, nach 15' reichliche, nach  $\frac{1}{2}$  h ausschließlich Granula vorhanden. Das Tier überlebte, während das andere an typischer, fortschreitender Vibrionenvermehrung starb. — Am nächsten Tage erhielten 3 Meerschweinchen mit je 1 Oese Cholera 0,1 ccm MsJ, MsR und das Kontrollserum. Bei den beiden ersten Tieren war die Granulabildung nach  $\frac{1}{2}$  h fast vollkommen, nach 1 h war die Reaktion abgelaufen. Beide überlebten, während das dritte Tier unter Vibrionenvermehrung in der Nacht starb.

Versuch XXX. Je 3 Agarkulturen von Cholera Pfeiffer werden in 0,35 ccm Immunserum (I) (auf 5 ccm mit NaCl-Lösung aufgefüllt) und in 35 ccm inaktive Rinderserum (II), das in 2 Portionen zugesetzt wurde, aufgeschwemmt und 3 h bei 42° belassen. Dann wurden die Bodensätze durch Zentrifugieren gewonnen, sorgfältig gewaschen und mit je 2 ccm aktiven, frischen Meerschweinchenserums in 2 Portionen ca. 1 h bei 42° gehalten. Dabei trat bei den Vibrionen der Probe I fast vollständige, bei II sehr weitgehende Granulabildung auf. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten

wurden  $\frac{1}{2}$  h auf  $56^{\circ}$  erhitzt und mit einer Kontrollprobe nicht mit Vibrionen versetzten Meerschweinchenserums verwendet. — Die Agglutinationsprüfung ergab auch mit 0,5 ccm nirgends eine deutliche Wirkung. Der bakteriolytische Versuch verlief so, daß die Flüssigkeit von II zwar die bakteriolytische Wirkung von 0,1 ccm Meerschweinchenserum bedeutend erhöhte, was aber auch normales, inaktives Meerschweinchenserum bis zu einem gewissen Grade tat. Die Flüssigkeit von I war ohne Effekt. Einsaat ca. 1 Mill. Cholera kolonien.

	von I	von II	von Kontrolle	von Immunsrum
0,001 ccm	ca. 1 000 000	28 000	65 000 ?	1200
0,005 „	desgl.	8800	500 000	0
0,01 „	desgl.	1400	280 000	10 000
0,05 „	ca. 500 000	7600	40 000	14 001

Bei den Meerschweinchen, welche 0,1 ccm von I, 0,1 und 0,01 ccm von II gleichzeitig mit 1 Oese Cholera erhielten, war die Bakteriolyse innerhalb 1 h vollständig abgelaufen. Das Kontrollserum (0,1 ccm) ließ fortschreitende Vermehrung zu, welche das Tier in der Nacht tötete.

Versuch XXXI. 10 Agarkulturen von Cholera wurden zunächst in NaCl-Lösung aufgeschwemmt und durch Zentrifugieren von anhaftender Nährlösung befreit. Der Satz wurde in ca. 140 ccm inaktiven ( $\frac{1}{2}$  h  $56^{\circ}$ ) Rinderserums aufgenommen und ca. 2 h bei  $42^{\circ}$  gehalten. Die agglutinierte Bakterienmasse wurde sodann sorgfältig gewaschen und in zwei gleiche Hälften geteilt. Der einen wurde in 3 Portionen 3 ccm aktives Meerschweinchenserum, der anderen ebensoviel NaCl-Lösung zugesetzt. Während des ca. 1 h Aufenthaltes bei  $42^{\circ}$  waren im Meerschweinchenserum überwiegend Granula entstanden, während in der Kochsalzlösung die Vibrionen unverändert blieben. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten I und II, sowie eine Probe ohne Vibrionen belassenen Meerschweinchenserums wurden dann  $\frac{1}{2}$  h auf  $56^{\circ}$  erhitzt.

Der Tierversuch ergab bei 0,05 ccm von I vollständigen Ablauf der Bakteriolyse von 1 Oese Cholera vibrionen innerhalb  $\frac{1}{2}$  h; bei 0,005 ccm fand binnen 2 h sehr starke, aber nicht vollständige Granulabildung statt. Später erfolgte eine dürftige Vibrionenvermehrung und das Tier starb mit vibrionenarmen Exsudate. 0,0005 ccm erzeugten zwar noch Granulabildung, doch kam diese gegen die Vibrionenvermehrung nicht auf. Die Menge von 0,05 und 0,005 ccm von II brachte 1 Oese Cholera nach 1 und 2 h zur Granulabildung. Das Kontrollserum III vermochte keine Beeinflussung der Vibrionenvermehrung herbeizuführen.

Beim bakteriolytischen Plattenversuche mit einer Einsaat von ca. 400 000 Vibrionen und 0,1 ccm aktivem Meerschweinchenserum ergab sich:

	von I	von I	von III	von Choleraimmunserum
0,001 ccm	200 000	6800		2800
0,005 „	800	0		80
0,01 „	3200	8800		0
0,05 „	3500	7500		ca. 10 000
		} ca. 600 000		

Die Agglutinationsprüfung wurde nicht nur an den Flüssigkeiten I—III allein vorgenommen, sondern auch nach einem Zusatz von aktivem Meerschweinchenserum <sup>1)</sup>).

Zusatz von aktivem Meerschweinchenser.	von I			von II			von III	
	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm
0	0	0	0	+ ?	0	0	0	0
0,2 ccm	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
0,1 „	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ ?	+ ?
0,05 „	++	++	+	++	+	+	0	0

Das aktive Meerschweinchenserum allein lieferte nur in 0,2 ccm ganz schwache Agglutination.

Versuch XXXII. Je eine Agarkultur wurde mit je 7,5 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, zentrifugiert, die Bodensätze gewaschen und a) mit 2 ccm aktivem Meerschweinchenserum und b) ebensoviel NaCl-Lösung 2<sup>h</sup> bei 42° behandelt. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten, zu denen als Kontrolle (c) noch das nicht mit Vibrionen behandelte Meerschweinchenserum kam, wurden  $\frac{1}{4}$  auf 56° erhitzt. Der Tierversuch ergab vollständige Granulabildung von 1 Oese Cholera durch 0,1 ccm von a und b. Die Agglutinationsprüfung zeigte:

Zusatz v. akt. Meer- schweinchenserum	von I			von II			von III	
	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1 ccm	+++	+++	fast +++	fast +++	++	++	++	+
0,05 „	++	++	+	+ ?	+ ?	0	0	0

Versuch XXXIII. Je 2 Agarkulturen Cholera wurden gewaschen, in je 8 ccm inaktivem (56°) Rinderserum aufgeschwemmt,  $1\frac{1}{2}$  h bei 42° gehalten, zentrifugiert und gewaschen. Je eine Portion wird a) mit 2 ccm aktivem Meerschweinchenserum, b) mit 2 ccm NaCl-Lösung versetzt und 1<sup>h</sup> bei 42° gehalten. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten werden mit einer Probe nicht behandelten Meerschweinchenserums als Kontrolle (c)  $\frac{1}{4}$  auf 56° erhitzt. Der Tierversuch wurde an je 2 Meerschweinchen durchgeführt, welche beide je 0,05 ccm von a, b und c ip. erhielten. Ein Meerschweinchen erhielt danach gleichzeitig 1 Oese Typhus, das andere 1 Oese Cholera-bacillen. Alle Tiere, welche Typhusbacillen erhalten hatten, starben widerstandslos an üppiger Bakterienvermehrung mit schwerster Infektion. Ebenso ging das Meerschweinchen mit der Kontrollprobe c an schwerster Cholera-infektion zugrunde. Die Flüssigkeiten a und b dagegen bewirkten inner-

1) Es bedeutet: +++ vollkommene, ++ starke, + deutliche Agglutination, + ? eine unsichere Reaktion.



halb  $\frac{1}{3}$  vollständige Granulabildung. Ein Tier überlebte, das andere ging nach 20<sup>h</sup> mit vollkommen steriler Bauchhöhle an Choleravergiftung ein.

Der bakterizide Plattenversuch, bei dem zu 0,1 ccm Meerschweinchen-serum wechselnde Mengen von a, b und c angesetzt wurden, ergab bei einer Choleraeinsaat von ca. 600 000 Keimen:

	von a	von b	von c
0,005 ccm	10 000	23 000	} ca. 500 000
0,01 „	2700	18 000	
0,05 „	14 000	20 000	

Meerschweinchen Serum allein lieferte 450 000 Kolonien.

Eine Typhuseinsaat von ca. 400 000 Keimen wurde durch das Meerschweinchen Serum allein bis auf ca. 70 000 Keime abgetötet. Fast genau die gleichen Zahlen lieferte der Zusatz der Versuchsflüssigkeiten.

	von a	von b	von c
0,005 ccm	40 000	35 000	50 000
0,01 „	40 000	35 000	40 000
0,05 „	30 000	30 000	40 000

Der Agglutinationsversuch ergab:

Zusatz v. akt. Meer- schweinchen Serum	von a		von b		von c	
	0,1 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm
0,1 ccm	+++	++	fast +++	++	+?	++?
0,05 „	++	+	+	+	0	+0

Aktives Meerschweinchen Serum allein gab in der Menge von 0,1 ccm vielleicht eine geringe Spur von Agglutination. Typhusbacillen zeigten bei der gleichen Versuchsanordnung keine Agglutination.

Die mitgeteilten Versuche lassen deutlich erkennen, daß es auch außerhalb des Tierkörpers mit Leichtigkeit gelingt, den an Vibrionen gebundenen Immunkörper wieder abzutrennen. Sowohl im aktiven Meerschweinchen Serum als in der indifferenten Kochsalzlösung kann man ihn ohne eingreifende Maßnahmen wiedererhalten, und zwar bezieht sich das sowohl auf einen immunisatorisch erzeugten Ambozeptor wie auf den genauer und später fast ausschließlich untersuchten Immunkörper des Rinderserums. Die Ursache der Lostrennung desselben von den Vibrionen kann die Temperatur und der Wechsel des Mediums sein. Bezüglich der Temperatur ist zu bemerken, daß die Besetzung und die Lostrennung bei der gleichen Temperatur 40—42° erfolgte; sie kann also, wie auch spätere Versuche nachweisen, nur unterstützend auf den bedeutungsvolleren Wechsel des Mediums eingewirkt haben.

Von den bisherigen Angaben über ähnliche Versuche berühren die von Landsteiner und Jagič<sup>1)</sup> die mitgeteilten am nächsten. Sie brachten große Mengen von Typhusbazillen mit sehr viel (6 l) Rinderserum zusammen, gewannen nach längerem Stehen den Bodensatz, den sie wuschen und bei 56° mit Kochsalzlösung behandelten. Die abzentrifugierte Flüssigkeit zeigte schwach agglutinierende Wirkung und vermochte in der Menge von 2—3 ccm Meerschweinchen gegen eine tödliche Typhusinfektion zu schützen. „In ganz ähnlicher Weise ließen sich die agglutinierenden Stoffe eines durch Immunisierung mit Vibrionen gewonnenen Kaninchenserums aus den agglutinierten Vibrionen teilweise wiedergewinnen.“ Die Verfasser weisen auf ihre Absicht hin, weitere Versuche über die Gewinnung antibakterieller Stoffe aus Serum anzustellen; doch ist seither in der uns zugänglichen Literatur nichts über den Gegenstand erschienen, wie überhaupt diese wichtigen Versuche von Landsteiner und Jagič, soweit uns bekannt, nicht die Beachtung gefunden haben, die sie verdienten.

Unsere eigenen Ergebnisse bestätigen sie ganz. Wenn Landsteiner und Jagič, obwohl sie bei Rinderserum mit einem sehr großen Materialverbrauch arbeiteten, eine relativ geringe Ausbeute an antibakteriellen Stoffen hatten, so liegt das wohl an der Wahl des Typhusbacillus, der tatsächlich nach einigen orientierenden Versuchen weniger geeignet erscheint als der *Cholera vibrio*, andererseits an der Abspaltungstemperatur, welche besser niedriger gewählt wird.

Weit zahlreicher sind die Angaben über Abspaltung von Häm- und Bakterioagglutininen und auch Hämolsinen und Präzipitinen (Hahn und Trommsdorff, Landsteiner und Reich, Landsteiner und Jagič, Morgenroth, Müller, Muir, Eisenberg u. a.). Doch soll sich die vorliegende Mitteilung hauptsächlich auf die bakteriolytischen Wirkungen beziehen. Die bisherigen Befunde bezüglich der Agglutination und Präzipitation sollen nur kurze Erwähnung finden, was um so eher geschehen kann, als sie sicher in allernächster Beziehung zu der Bakteriolyse stehen. Darüber müssen noch genauere

1) Münch. med. Wochenschr., 1903, p. 764.

Untersuchungen angestellt werden, von welchen eine einheitliche definitive Auffassung des Problems der Serumaktivität zu erhoffen ist.

Unter Benutzung der mikroskopischen Beobachtungsmethode wurde zunächst untersucht, worin der Grund zur Abgabe der bereits von Vibrionen gebundenen Immunkörper zu suchen sein könnte. Da bereits bekannt war, daß bei ein und derselben Temperatur, die meist bei 40—42° gewählt wurde, sowohl die Besetzung von normalen Vibrionen mit Immunkörpern als die Abgabe der gebundenen erfolgen kann, so konnte die Temperatur nicht die Hauptrolle spielen. Von sonstigen Momenten kam aber nur eines in Betracht, der Wechsel des Mediums. Die Temperatur spielt daneben nur eine unterstützende Rolle, die allerdings nicht vernachlässigt werden darf.

Versuch XXXIV. Zwei Agarkulturen Cholera wurden mit 20 ccm inaktivem Rinderserum (56°) sensibilisiert, gewaschen und in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine davon wird mit 1 ccm NaCl-Lösung bei 42°, der andere bei 60° 1<sup>h</sup> digeriert. Von den abzentrifugierten Extrakten wird der bei 42° gewonnene in zwei Hälften geteilt, deren eine unverändert belassen, die andere 1<sup>h</sup> bei 60° erhitzt wird. Als Komplement dient 0,025 ccm Meerschweinchenserum für jede Probe.

	Extrakt 42°	Extrakt 42° 1 <sup>h</sup> auf 60° erhitzt	Extrakt 60°
0,05 ccm	Fast nur Granula, meist in Haufen.	In allen Mengen un- gefähr wie die vor- stehenden Proben	Ziemlich viel freie Vibrionen, daneben Granula in großen Haufen
0,01 „	Weit überwiegend Granula, zerstreute Vibrionen	dgl.	Vibrionen und Gra- nula ungefähr gleichviel
0,005 „	Ungefähr gleichviel Granula und Vi- brionen	dgl.	Spärlich Granula, massenhaft freie Vibrionen

Versuch XXXV. 3 Agarkulturen Cholera wurden mit 15 ccm inaktivem Rinderserum (56°) bei 40° sensibilisiert. Die in 3 Teile geteilten, sorgfältig gewaschenen Vibrionen wurden dann 1<sup>h</sup> bei 20° (a), 41° (b) und 60° (c) mit je 1 ccm NaCl-Lösung digeriert. Nach Zentrifugieren und Abgießen der obenstehenden Flüssigkeiten wurden die Sätze neuerlich gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° neuerlich digeriert. Die dann durch Zentrifugieren gewonnenen Flüssigkeiten a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub> wurden ebenfalls untersucht. Als Komplement diente 0,025 ccm Meerschweinchenserum, das im Kontrollversuch wirkungslos war<sup>1)</sup>.

1) Etwas Granulabildung bewirkte bei der großen Empfindlichkeit unseres Cholerastammes fast jedes Meerschweinchenserum. Die Granula

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von a	Fast nur Vibrionen, selten spärliche Granula, meist in lockeren Haufen		
von b	Sehr viele Granula in Haufen und zerstreut		Die Zahl der Vibrionen überwiegt die der Granula
von c	Granulabildung vorhanden, aber gering		Fast nur Vibrionen
von a <sub>1</sub>	Reichliche Granulabildung		Ueberwiegend Vibrionen
von b <sub>1</sub>	Etwa gleiche Hälften von Vibrionen und Granula		Ueberwiegend Vibrionen
von c <sub>1</sub>	Sehr geringe Granulabildung		Fast nur Vibrionen
Rinder- serum 56°	Nur Granula in Haufen	Meist Granula in Haufen, einige freie Vibrionen	Wenig Granula, reichlich Vibrionen

Versuch XXXVI. 2 Agarkulturen Cholera werden mit 20 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert. Der in 3 Teile geteilte Bodensatz wird sorgfältig gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> a) bei 20°, b) bei 42°, c) bei 62° digeriert. Ein Teil der abzentrifugierten Flüssigkeit von b wird nachträglich 1<sup>h</sup> auf 62 und 66° erhitzt. Die Bodensätze werden nach der ersten Behandlung nochmals gewaschen und alle mit je 1 ccm NaCl-Lösung neuerlich 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert. Flüssigkeiten a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>.

Temperaturen von 60—66° liefern in Kochsalzlösung keine wirksamen Extrakte mehr und der Versuch einer nachträglichen Extraktion bei 42° zeigt, daß die Immunkörper, die an die Vibrionen gekettet sind, dabei Schaden gelitten haben müssen. Damit stimmt das Ergebnis überein, daß sonst wirksame, bei 42° erhaltene Extrakte bei höherer Temperatur eine bis zur Wirkungslosigkeit gehende Abschwächung zeigen.

Was die zwischen 42° und 60° liegende Temperatur betrifft, so schwanken die Ergebnisse etwas; es kam vor, daß bei 50° noch ziemlich ebenso immunkörperhaltige Kochsalzextrakte gewonnen wurden wie bei 42°, bei 56° waren sie meist schwächer, und wenn es sich darum handelt, möglichst kräftige Flüssigkeiten zu erhalten, ist es nicht ratsam, die sensibilisierten Vibrionen mit Kochsalzlösung bei einer höheren Temperatur als 45° zu digerieren.

Es ließ sich übrigens leicht zeigen, daß der bakteriolytische Immunkörper des Rinderserums selbst sehr wärmeempfindlich

liegen entweder zerstreut zwischen zahlreichen normalen Vibrionen oder sie bilden lockere Haufen. Man wird bei einiger Uebung durch diese normale Wirkung, die nicht ausdrücklich verzeichnet ist, kaum in Verlegenheit kommen.

ist, indem er bei Temperaturen über  $60^{\circ}$  schon merklich geschädigt, bei  $65-66^{\circ}$  vernichtet wird <sup>1)</sup>. Ein solches Serum vermag dann natürlich auch keine Vibrionen mehr zu sensibilisieren und mit seiner Hilfe lassen sich immunkörperhaltige Extrakte in Kochsalzlösung nicht mehr gewinnen.

Versuch XXXVII. Je  $\frac{1}{2}$  Agarkultur Cholera wird mit je 6 ccm Rinderserum welches a) bei  $57^{\circ}$ , b) bei  $62^{\circ}$ , c) bei  $65-66^{\circ}$   $\frac{1}{2}$  h lang erhitzt war, 1 h lang bei  $42^{\circ}$  sensibilisiert. Bei a tritt vollkommene, bei b ganz schwache, bei c gar keine Agglutination ein. Die Vibrionensätze werden gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1 h bei  $42^{\circ}$  digeriert. Als Kontrolle dienen in der angegebenen Weise erhitzte, aber nicht mit Vibrionen behandelte Rindersera.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von a	Fast nur Granula in kleinen und großen Haufen		Weit überwiegend Granula, meist in Haufen. Zerstreute Vibrionen
von b	Granula in Haufen zerstreut, überall massenhaft	Vibrionen	
von c	Fast nur Vibrionen, wie im Meerschweinchenkomplement allein		
Rinderserum $57^{\circ}$	Ausschließlich Granula in Haufen		Sehr vereinzelt Vibrionen, sonst nur Granula in Haufen
Rinderserum $62^{\circ}$	Ueberwiegend Granula, dazwischen überall Vibrionen mit Granula gemischt, in Haufen und frei		Granula noch in Uebersahl, aber bereits viele Vibrionen.
Rinderserum $65-66^{\circ}$	Fast ausschließlich Vibrionen mit geringer Granulabildung, wie im Meerschweinchenkomplement allein.		
	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von a	Granula in Haufen neben zahlreichen Vibrionen	Sehr zahlreiche freie Vibrionen; daneben Granula in Haufen	
von b	Ausschließlich Granula in Haufen		Massenhaft Granula in Haufen und einzeln; daneben freie Vibrionen
von b, 1 h $62^{\circ}$	Granula meist einzeln neben massenhaften freien Vibrionen	Fast nur freie Vibrionen	
von b, 1 h $66^{\circ}$	Granula hier und da in Haufen; überall massenhaft freie Vibrionen		
von c	Neben kleinen Haufen von Granula überall massenhaft	Vibrionen	
von a,	Sehr starke Wirkung; bis zur letzten Dosis herab fast nur Granula in Haufen und zerstreut		

1) Rindersera verhalten sich bei dieser Temperatur nicht ganz gleichmäßig. Die meisten werden nur opaleszent, andere sind schon zähflüssig, noch andere, die dann natürlich nicht verwendet werden können, gerinnen bei ziemlich erhaltener Durchsichtigkeit.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von $b_1$	Massenhaft Granula in Haufen und zerstreut, neben einzelnen Vibrionen		Etwas mehr Vibrionen neben sehr viel Granula
von $c_1$	Granula in lockeren Haufen und freien Vibrionen	einzelne neben massenhaften	
Rinder-serum 56°	Ausschließlich Granula in Haufen.		

Meerschweinchenkomplement allein in der Dosis 0,025 ccm. Granula in lockeren Haufen hier und da neben massenhaften freien Vibrionen.

Die Versuche sind ganz klar und eindeutig: die bei 40 bis 42° mit inaktivem Rinderserum sensibilisierten Vibrionen geben in Kochsalzlösung die aufgenommenen Immunkörper wieder ab, wobei die Temperatur eine wichtige Rolle spielt. Bei 20°, ungefähr bei Zimmertemperatur, findet innerhalb kurzer Zeit nur eine ganz unmerkliche Abgabe statt<sup>1)</sup>; ob sie bei längerer Versuchsdauer stärker hervortritt, ist nicht untersucht, erscheint aber sehr wohl möglich. Aus solchen sensibilisierten Vibrionen läßt sich nachträglich durch Erhöhung der Temperatur ein sehr wirksamer Extrakt gewinnen, womit das Festhalten des Immunkörpers an den Vibrionen bei 20° bewiesen ist.

Sehr günstig für die Abgabe des Immunkörpers ist die Temperatur von 40—42°, also die gleiche Temperatur, bei der unter anderen Verhältnissen die Aufnahme des Immunkörpers, die Sensibilisierung erfolgt. Daraus geht mit Sicherheit hervor, daß das Entscheidende für die Abspaltung bei solchen Versuchen der Wechsel des Mediums ist. Eigene Versuche zeigten, daß auch bei 37° einerseits Herantreten des Immunkörpers an Vibrionen in inaktivem Rinderserum, andererseits Ablösung desselben in Kochsalzlösung erfolgt, wobei auch der quantitative Unterschied gegen eine Temperatur von 40—42° nicht groß ist. Man arbeitet aber besser bei der höheren Wärme, welche die sonst eintretende und schwer kontrollierbare Vibrionenvermehrung zurückhält oder doch beschränkt.

Die Schädigung, welche der Immunkörper des Rinderserums bei höherer Temperatur erlitten haben muß, tritt bei den Abspargungsversuchen weit deutlicher hervor als bei der

1) Vgl. dazu analog verlaufene Versuche von Peiffer und Friedberger: a. a. O., p. 83.

Untersuchung des erhitzten Serums allein. So wirkt das auf 62° erhitzte Rinderserum an sich noch ziemlich gut, aber es liefert nur sehr schwache Immunkörperextrakte mit Kochsalzlösung, was unter Berücksichtigung der Quantitätsverhältnisse leicht zu verstehen ist. Von großem theoretischen Interesse ist aber diese Feststellung auch deshalb, weil bei ungefähr den gleichen Temperaturen, bei denen der bakteriolytische Immunkörper des Rinderserums leidet und zugrunde geht, auch die agglutinierende und präzipitierende Wirkung vollständig verschwindet. Unterschiede in der Hitzeempfindlichkeit können sonach keine wesentlichen Anhaltspunkte dafür geben, die bakteriolytische, agglutinierende und präzipitierende Serumwirkung auf verschiedene Stoffe *sui generis* zurückzuführen, wenigstens soweit das normale Serum in Betracht kommt.

In dieser Hinsicht erweist sich das Immunserum als weit widerstandsfähiger. Die bakteriolytischen Immunkörper derselben vertragen die Temperatur von 65—66° ganz gut, wie dies auch für die Agglutination durch Immunserum bekannt ist.

Versuch XXXVIII. Je 2 Kulturen von Cholera werden a) mit 25 ccm inaktivem Rinderserum, b) mit 25 ccm einer Immunserumverdünnung 1:100  $\frac{3}{4}$ h bei 42° sensibilisiert. Die gewaschenen, entsprechend verteilten Bodensätze werden mit je 1 ccm NaCl-Lösung in folgender Weise behandelt:

I.	mit inaktivem Rinderserum sensibilisierte Vibrionen	1h 42°
II.	„ „ „ „ „	1h 65°
III.	„ Immunserum „ „ „	1h 42°
IV.	„ „ „ „ „	1h 65°

Gleichzeitig mit dieser Probe war inaktives Rinderserum und Immunserumverdünnung der entsprechenden Temperatur ausgesetzt. Nach Abzentrifugieren der Vibrionen wurde die klare Flüssigkeit I—IV verwendet.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von I	Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula, in Haufen und zerstreut		
von II	Weit überwiegend Vibrionen, wenige zerstreute Granula	Fast nur Vibrionen, Granula sehr wenig, in lockeren Haufen, wie in Meerschweinchenkomplement allein	
von III	Weitaus überwiegend Granula, zerstreut und in Haufen, doch überall auch noch freie Vibrionen		
von IV	Freie Vibrionen überwiegend, daneben Granula selten und in lockeren Haufen	Fast nur Vibrionen	
Kontrolle I	Nur Granula in Haufen		Selten einzelne Vibrionen, sonst nur Granula

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Kontrolle II	Fast nur Vibrionen. Granula wie im Komplement allein		
Kontrolle III	Ausschließlich Granula, fast immer in Haufen		
Kontrolle IV	Nur Granula in Haufen	Granula überwiegen, daneben einzelne Vibrionen	

Versuch XXXIX. Je 2 Kulturen von Cholera werden mit 20 ccm inaktivem (56°) Rinderserum und 20 ccm einer Immunserumverdünnung 1:250 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert. Die Agglutination durch Immunserum verläuft dabei sehr langsam. Die gewaschenen, entsprechend verteilten Bodensätze werden mit je 1 ccm NaCl-Lösung behandelt:

I.	mit inaktivem Rinderserum sensibilisierte Vibrionen	1 <sup>h</sup> 42°
II.	" " "	1 <sup>h</sup> 65°
III.	" Immunserum "	1 <sup>h</sup> 42°
IV.	" " "	1 <sup>h</sup> 65°

Die davon abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden verwendet. Die entsprechenden Kontrollen waren gleichzeitig mit den Versuchsproben der Temperatur von 42° und 65° ausgesetzt. Ein Teil von I und III wurde nachträglich 1<sup>h</sup> auf 65° erhitzt.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von I	Ausschließlich Granula, meist in Haufen		
von I 1 <sup>h</sup> 65°	Reichlich Vibrionen, sehr viel Granula in Haufen	Überwiegend freie Vibrionen, daneben noch Granula teils in Haufen, teils zerstreut	
von II	Genau wie vorige Probe		
von III	Weit überwiegend Granula, frei und in Haufen, daneben wenige Vibrionen	Ungefähr gleichviel Vibrionen und Granula	
von III 1 <sup>h</sup> 65°	Ungefähr gleichviel Granula und Vibrionen, erstere meist in Haufen	Massenhaft Vibrionen, wenige Granula mit Vibrionen gemischt in Haufen	
von IV	Massenhaft Vibrionen mit weniger Granula, meist in Haufen	Sehr wenig Granula	
Kontrolle I	Nur Granula in Haufen		
Kontrolle II	Fast ausschließlich Vibrionen,	wenige Granula in Haufen	
Kontrolle III	Nur Granula in Haufen	Weit überwiegend Granula, wenige zerstreute Vibrionen	
Kontrolle IV	Weit überwiegend Granula in Haufen, daneben einzelne Vibrionen	Zahl der Vibrionen zugenommen, doch überwiegend Granula	
Komplement allein:	Bis auf einige lockere Granulahaufen von Vibrionen.		

Zweifellos hat sich das Immunserum in seiner Verdünnung weit hitzebeständiger erwiesen, als das Rinderserum. Dennoch ist eine gewisse Abschwächung nach der Erhitzung festzustellen; sie ist recht geringfügig beim Immunserum allein, aber bei dem Versuche aus damit sensibilisierten Vibrionen bei 65° wirksame Flüssigkeiten zu erhalten, ist die Ausbeute ge-



ring. Darin stimmen Normal- und Immunserum mehr überein. Doch können weitergehende Folgerungen über Verschiedenheit oder Identität des normalen und des immunisatorisch gewonnenen Choleraambozeptors daraus allein nicht gezogen werden.

Es war nun erforderlich, genauer zu untersuchen, von welchem Einflusse das Medium auf die Abspaltung bereits von Vibrionen gebundener Immunkörper ist. Die Temperatur blieb dabei gleich, d. h. die Besetzung der Vibrionen mit dem Immunkörper und die Abspaltung derselben wurde immer bei den gleichen Wärmegraden (meist 40—42°) vorgenommen.

Versuch XL. 5 Kulturen Cholera werden mit 30 ccm inaktivem (56°) Rinderserum  $\frac{1}{4}$  h bei 42° behandelt. Die Bakterienmasse wird sodann in 5 Teilen zentrifugiert, gewaschen und 1 h bei 42° mit je 1 ccm von folgenden Flüssigkeiten behandelt:

- 1) 1 Kultur + 1 ccm aktiven Rinderserums,
- 2) 1 „ + 1 „ inaktiven Rinderserums (56°),
- 3) 1 „ + 1 „ Rinderserum, das in aktivem Zustande mit Vibrionen erschöpft war,
- 4) 1 „ + 1 „ Rinderserum, das in inaktivem Zustande mit Vibrionen erschöpft war,
- 5) 1 „ + 1 „ NaCl-Lösung.

Die Erschöpfung des Serums in 3 und 4 war in der Weise erfolgt, daß am Vorabend je eine Agarkultur Cholera mit je 4 ccm aktivem und inaktivem Serum vermischt, über Nacht bei Zimmertemperatur belassen und schließlich abzentrifugiert wurde. Vor dem Versuche wurden die Proben 1 und 3 und die entsprechenden, ohne Vibrionen belassenen Kontrollen  $\frac{1}{3}$  h auf 56° erhitzt.

	0,1 ccm	0,5 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Rinderserum 56°	Nur Granula in Haufen		Fast nur Granula in Haufen, selten einzelne Vibrionen	
Rinderserum aktiv, erschöpft, dann 56°	Nur Vibrionen in kleinen dichten Häufchen		Massenhaft meist einzeln liegende Vibrionen. Einzelne lockere Granulahaufen	
Rinderserum inaktiv, erschöpft, Extrakt 1	Ganz wie die vorstehende Probe			
Extrakt 2	Nur Granula in Haufen		Meist Granula in Haufen, spärliche Vibrionen	
Extrakt 3 }	Nur hie und da ein lockerer Granulahaufen, sonst massenhaft Vibrionen, in Häufchen und einzeln			
Extrakt 4 }	Bis auf einzelne lockere Granulahaufen nur Vibrionen, teils (bei den höheren Dosen) in Häufchen, teils frei.			
Extrakt 5	Ausschließlich Granula		Granula überwiegen weitaus, daneben einzelne Vibrionen.	

Meerschweinchenkomplement allein: Fast nur Vibrionen.

Versuch XLI. 3 Kulturen Cholera werden in 30 ccm inaktivem (56°) Rinderserum bei 42° sensibilisiert. Der in 3 Teile geteilte, gewaschene Bodensatz wird 1h bei 42° digeriert mit je 1 ccm 1) aktivem, 2) inaktivem (56°) Rinderserum, 3) NaCl-Lösung. Nach dem Zentrifugieren werden die Bodensätze wieder gewaschen und alle mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1h bei 42° digeriert; dadurch ergeben sich die Extrakte 4, 5, 6.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm
Rinder- serum 56°	Ausschließlich Granula in großen und mit der absteigenden Dosis kleiner werdenden Haufen			Sehr viel Granula, daneben zahlreiche Vibrionen
Extrakt 1	In allen Präparaten viele Granula in Haufen, daneben zunehmend mehr freie Vibrionen			Wenige Granulahaufen, massenhaft freie Vibrionen
Extrakt 2	Hie und da Granula in Haufen, aber Vibrionen, im ersten Präparate oft sonst frei			überall massenhaft Vibrionen in kleinen Häufchen,
Extrakt 3	Ausschließlich Granula in meist sehr großen Haufen			Neben viel Granula auch freie Vibrionen
Extrakt 4	Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula in Haufen			Noch massenhaft Granula in lockeren Haufen und einzeln daneben sehr viel freie Vibrionen
Extrakt 5	Wie Extrakt 4			
Extrakt 6	Nur Granula in lockeren Haufen	Fast nur Granula einzeln und in lockeren Haufen. Daneben spärlich Vibrionen		Reichlich freie Vibrionen. Granula in lockeren Haufen und einzeln.
Meerschweinchenkomplement	allein: Hie und da Haufen, sonst Vibrionen.			Granula in lockeren

Versuch XLII. 5 Kulturen Cholera werden mit 35 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1h bei 42° sensibilisiert. Die in 5 Teile geteilte gewaschene Vibrionenmasse wird sodann in folgender Weise 1h bei 42° behandelt:

- 1) 1 Kultur + 1 ccm aktiven Rinderserums,
- 2) 1 „ + 1 „ inaktiven (56°) Rinderserums,
- 3) 1 „ + 1 „ aktiven Kaninchenserums,
- 4) 1 „ + 1 „ inaktiven (56°) Kaninchenserums,
- 5) 1 „ + 1 „ NaCl-Lösung.

Nach Abzentrifugieren der Bodensätze werden die Flüssigkeiten von 1 und 3 bei 56°  $\frac{1}{2}$ h inaktiviert. Die Bodensätze selbst werden gewaschen und dann sämtlich nochmals mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1h bei 42° extrahiert, was die Extrakte 6—10 gibt.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Rinderserum 56°	Ausschließlich Granula in Haufen			Weit überwiegend Granula
Extrakt 1	Fast nur Granula in Haufen, sehr selten einzelne Vibrionen	Granula weit überwiegend; Vibrionen mit Granula gemischt in Haufen		Vibrionen etwas mehr als Granula

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
<b>Extrakt 2</b>	Vibrien massenhaft, nur hie und da lockere Granulahaufen			
<b>Extrakt 3</b>	Fast nur Granula, meist in Haufen, da- zwischen zerstreut spärliche Vibrien			
<b>Extrakt 4</b>	Vibrien massenhaft, hie und da lockere Haufen von Granula			
<b>Extrakt 5</b>	Ausschließlich und fast ausschließlich Granula			
<b>Extrakt 6</b>	Granula in Haufen, sehr spärlich Vibrien	Zunahme der Vibrien, aber Granula in überwiegender Zahl	Mehr Vibrien als Granula	
<b>Extrakt 7</b>	Überwiegend Granula, mit mehr weniger Vibrien gemischt			
<b>Extrakt 8</b>	Überwiegend Granula			
<b>Extrakt 9</b>	Fast nur Granula	Granula weit überwiegend		Mehr Vibrien als Granula
<b>Extrakt 10</b>	Fast nur Granula	Sehr überwiegend Granula	Ungefähr gleich- viel Vibrien und Granula	Mehr Vibrien als Granula

Meerschweinchenkomplement: Vibrien, selten lockere Granulahaufen.

Versuch XLIII. 5 Kulturen Cholera werden mit 56 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert. Die in 7 Teile geteilte gewaschene Vibrienmasse wird in folgender Weise 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert.

- 1) Sensibilisierte Vibrien + 1 ccm NaCl-Lösung,
- 2) „ „ + 1 „ aktiven Rinderserums,
- 3) „ „ + 1 „ inaktiven (56°) Rinderserums,
- 4) „ „ + 1 „ aktiven Kalbserums,
- 5) „ „ + 1 „ inaktiven (56°) Kalbserums,
- 6) „ „ + 1 „ aktiven Kaninchenserums,
- 7) „ „ + 1 „ inaktiven (56°) Kaninchenserums.

Die Proben werden zentrifugiert und die Flüssigkeit von 2, 4 und 6  $\frac{1}{2}$  h bei 56° inaktiviert.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
<b>Extrakt 1</b>	Ausschließlich bis fast ausschließlich Granula, meist in Haufen			
<b>Extrakt 2</b>	Ausschließlich Granula in dichten, später lockerer werdenden Haufen			
<b>Extrakt 3</b>	Massenhaft Vibrien, in den höheren Dosen in kleineren Häufchen, sonst einzeln; hie und da Granula in lockeren Haufen, besonders in den niederen Dosen			
<b>Extrakt 4</b>	Ausschließlich Granula in Haufen und einzeln			
<b>Extrakt 5</b>	Nur Granula in Haufen	Granula in lockeren Haufen. Spärliche Vibrien	Sehr zahlreiche Vibrien, neben Granulahaufen	Vibrien, meist überwiegend
<b>Extrakt 6</b>	? <sup>1)</sup>	Ausschließlich Granula in Haufen und zerstreut		

1) In dem betreffenden Präparate fanden sich ganz im Gegensatz zu den übrigen der gleichen Serie ausschließlich Vibrien, so daß anzunehmen ist, daß bei der Herstellung dieser Versuchsproben der Zusatz von Komplement vergessen wurde.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Extrakt 7	Ausschließlich Vibrionen, in den höheren Dosen in Häufchen, sonst einzeln. Granulahaufen hie und da in den letzten beiden Präparaten			
Rinderserum	Ausschließlich Granula in Haufen			
56°				
Kalbserum	Ueberall nur Vibrionen, in den ersten beiden Präparaten in			
56°	Häufchen			
Kaninchen-	Nur Vibrionen, bei den höheren Dosen in Häufchen			
serum 56°				
Meerschweinchenkomplement	allein: Bis auf einzelne lockere Granulahaufen nur Vibrionen.			

Versuch XLIV. 9 Kulturen Cholera wurden mit 90 ccm inaktivem Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und die in 9 Teile geteilten gewaschenen Bodensätze mit je 1 ccm Kochsalzlösung und verschiedener Sera im aktiven und inaktiven Zustande ebensolange bei der gleichen Temperatur digeriert. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden verwendet, nachdem diejenigen, welche mit aktivem Serum hergestellt waren, vorher  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erhitzt wurden. Der Extrakt mit Kochsalzlösung brachte bis zu 0,01 ccm vollständige, bei 0,005 ccm nahezu vollständige Granulabildung hervor. Ebenso stark wirkte der Extrakt mit aktivem Rinderserum, während der mit inaktivem so gut wie wirkungslos war und nur in der Menge von 0,1 und 0,05 ccm Haufenbildung der sonst ganz normalen Vibrionen hervorbrachte. Extrakt mit aktivem Pferdeserum erzeugte mit 0,1 ccm fast vollständige, bis zu 0,01 ccm überwiegende Granulabildung, bei 0,005 ccm überwogen die Vibrionen weitaus. Inaktives Pferdeserum lieferte einen nahezu unwirksamen Extrakt. Extrakte mit Kaninchen- und Meerschweinchen- serum waren sowohl bei Verwendung aktiven wie inaktiven Serums sehr stark, bis zur Dosis 0,005 ccm herab, wirksam. Rinderserum in inaktivem Zustande erzeugt bis zu 0,005 ccm herab vollkommene Granulabildung, fast ebenso stark wirkte Pferdeserum, Meerschweinchen- serum war fast ganz wirkungslos, Kaninchenserum sehr wenig, nur in der Dosis von 0,1 ccm wirksam.

Versuch XLV. 9 Agarkulturen Cholera wurden bei 42° mit inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, so daß auf eine Kultur 12 ccm Rinderserum kamen. Die in 9 Teile geteilte, gewaschene Vibrionenmasse wurde hierauf mit je 1 ccm Kochsalzlösung und verschiedenen aktiven und inaktiven Seren 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten dienten zum Versuche, nachdem jene, bei welchen aktive Seren verwendet worden waren,  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erhitzt waren.

Der Kochsalzextrakt erzeugte bis zu 0,01 ccm herab vollständige Granulabildung. Extrakt mit aktivem Rinderserum lieferte bis 0,05 ccm herab vorwiegend Granula, bei 0,01 ccm traten schon reichlich Vibrionen auf, unter dieser Dosis überwogen Vibrionen. Inaktives Rinderserum lieferte einen fast völlig unwirksamen Extrakt. Aktives und inaktives Kalbserum verhielten sich diesmal als Extraktionsmittel völlig gleich und ergaben bei 0,1 ccm vollständige Granulabildung, bei 0,05 und 0,01 ccm blieben noch reichlich freie Vibrionen übrig. Aktives Schafserum

bewirkte starke, aber unvollständige Granulabildung bis zu 0,05 ccm, von da an überwogen Vibrionen. Inaktive Schafserumextrakte waren ohne Wirkung. Die Kontrolle mit inaktivem Rinderserum allein lieferte vollständige Granulabildung bis zu 0,005 ccm; inaktives Kalbserum und Kaninchenserum allein waren so gut wie ohne Wirkung, inaktives Schafserum ergab bis 0,01 ccm sehr starke, aber nicht mehr vollständige Granulabildung.

Mit Sicherheit geht aus diesen und anderen bisher angestellten Versuchen nur das eine hervor, daß Vibrionen, welche mit Rinderserum sensibilisiert sind, an neues inaktives Rinderserum nicht nur keine Immunkörper abgeben, sondern solche noch daraus aufnehmen. Auch wenn das Serum durch vorherige Behandlung mit Vibrionen seiner Immunkörper beraubt ist, vermag es die Abspaltung gebundener nicht zu bewirken. Aktives Serum verhält sich in der Regel etwas anders: es enthält nach der Behandlung mit sensibilisierten Vibrionen noch wirksame Immunkörper, wobei es aber zweifelhaft ist, ob diese von den Vibrionen abgesprengt sind, oder ob sie die ursprünglich im Serum enthaltenen darstellen. Nicht übereinstimmend verliefen die Versuche mit der Verwendung fremder Tiersera. In einigen Fällen lieferte allerdings nur aktives Serum wirksame Flüssigkeiten und es konnte bei der sonstigen Armut dieser Sera an Immunkörpern die Abspaltung derselben von den Vibrionen nicht zweifelhaft sein. In anderen Fällen wirkte aber inaktives Serum als Extraktionsmittel, und es scheint, als ob natürlich immunkörperreiche Tiersera im inaktiven Zustande schlechte, immunkörperarme aber gute Extraktionsmittel für die an Vibrionen gebundenen Rinderimmunkörper seien. Am meisten wurde mit Rücksicht auf die Tierversuche das Meerschweinchen-serum untersucht, dessen Eignung für die Aufnahme von gebundenen Immunkörpern die Regel ist.

Versuch XLVI. 2 Agarkulturen von Cholera wurden mit 20 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, in 2 Teile geteilt, gewaschen und mit je 1 ccm aktivem und inaktivem Meerschweinchen-serum 1<sup>h</sup> bei 42° gehalten. Dabei trat im aktiven Serum rasch und stark, im inaktiven keine Agglutination ein. Die Proben blieben über Nacht im Eisschrank und wurden dann zentrifugiert. Die abgegossenen Flüssigkeiten werden als Extrakt a<sub>1</sub> (von aktivem) und b<sub>1</sub> (von inaktivem Meerschweinchen-serum) bezeichnet. Die beiden Bodensätze, von denen der aus a fast nur Granula, der aus b fast nur Vibrionenhaufen enthielt, werden gewaschen und neuer-

lich 1<sup>h</sup> bei 42° mit aktivem und inaktivem Meerschweinchenserum behandelt, was die Extrakte a<sub>1</sub> und b<sub>1</sub> ergibt. Vor dem Versuche werden diejenigen Proben, zu deren Herstellung aktives Serum benutzt worden war, 1/2<sup>h</sup> auf 56° erwärmt. Als Komplementzusatz werden diesmal 0,05 ccm aktives Meerschweinchenserum verwendet, das an sich nur wenige Granula bildet.

Der Extrakt a<sub>1</sub> erzeugte in der Menge von 0,1 und 0,05 ccm durchgehend Granula, bei 0,01 ccm traten spärliche Vibrionen auf, bei 0,001 ccm war die Zahl der Granula und der Vibrionen ungefähr gleich.

Der Extrakt b<sub>1</sub> verhielt sich wie a<sub>1</sub>, nur in der letzten Dosis von 0,001 ccm überwogen bereits die Vibrionen die Granula.

Der Extrakt a<sub>2</sub> zeigte in der Dosis von 0,1, 0,05 und 0,01 ccm zwar sehr starke Granulabildung, bei 0,005 ccm waren ungefähr gleichviel Granula und Vibrionen vorhanden, 0,001 ccm hatten nur wenig Granula mehr erzeugt.

Der Extrakt b<sub>2</sub> brachte mit 0,1, 0,05 und 0,01 ccm überwiegende Granulabildung, aber bei steigender Zahl von Vibrionen hervor, bei 0,005 ccm waren Granula und Vibrionen an Zahl ungefähr gleich, bei 0,001 ccm war nur noch sehr geringe Wirkung.

Inaktives Rinderserum erzeugte bei 0,001 ccm vollständige Granulabildung, bei 0,005 ccm traten schon viele Vibrionen auf, um bei 0,001 ccm zu überwiegen. — Inaktives Meerschweinchenserum rief bei 0,1 ccm starke Vibrionenagglutination, aber nur sehr geringe Granulabildung hervor.

Versuch XLVII. 1 1/2 Agarkultur von Cholera wird mit 15 ccm inaktivem (56°) Rinderserum bei 42° sensibilisiert. Der in 3 Teile geteilte gewaschene Bodensatz wird a) mit aktivem, b) mit inaktivem (56°) Meerschweinchenserum, c) mit Kochsalzlösung (je 1 ccm) 1<sup>h</sup> bei 37° im Brutschrank digeriert. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten werden verwendet, nachdem a vorher 1/2<sup>h</sup> Erhitzung auf 56° unterzogen war.

Alle Extrakte lieferten in der Dosis von 0,1 ccm ohne Komplement nur Vibrionen. Das Komplement (0,025 ccm Meerschweinchenserum) allein erzeugte nur geringe Granulabildung neben massenhaften Vibrionen.

Die Extrakte a, b und c wirkten ungefähr gleich stark: 0,1 und 0,05 ccm riefen vollständige Granulabildung hervor, bei 0,01 ccm traten einzelne Vibrionen auf, bei 0,005 ccm war die Zahl der Granula und die der Vibrionen ungefähr gleich. Inaktives Rinderserum hatte die gleiche Wirksamkeit; inaktives Meerschweinchenserum war fast ohne Wirkung.

Versuch XLVIII. 1 1/2 Agarkultur Cholera wird mit 12 ccm inaktivem Rinderserum bei 42° sensibilisiert, und der in 3 Teile geteilte gewaschene Bodensatz mit a) 1 ccm aktivem, b) 1 ccm inaktivem Meerschweinchenserum, c) 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 37° im Brutschrank digeriert. Von den danach abzentrifugierten Flüssigkeiten wird a 1/2<sup>h</sup> auf 56° erhitzt. Mit 0,025 ccm aktivem Meerschweinchenserum als Komplement, das an sich so gut wie wirkungslos war, ergaben a und b in den Dosen von 0,1 und 0,05 ccm vollständige, bei 0,01 ccm fast vollständige, bei 0,005 ccm noch etwas überwiegende Granulabildung. Der Kochsalzextrakt

c war nur ganz unbedeutend schwächer. Inaktives Rinderserum allein wirkte ungefähr ebensostark wie die Extrakte a und b; inaktives Meerschweinchenserum war fast ohne Wirkung.

Meerschweinchenserum vermag also sowohl im aktiven wie im inaktiven Zustande gerade so gut wie Kochsalzlösung die an Vibrionen gebundenen Immunkörper des Rinderserums freizumachen. In den beiden letzten Versuchen ist noch bemerkenswert, daß die Sensibilisierung der Vibrionen bei 42°, die Abspaltung der Immunkörper bei der tierischen, also um ca. 5° niedrigeren Temperatur erfolgte und ohne weiteres gelang. Auch die Exsudatflüssigkeit des Meerschweinchenperitoneums wirkt wie das Serum.

Versuch XLIX. 1 Agarkultur Cholera wird mit 15 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert. Die in 3 Teile geteilte gewaschene Vibrionenmasse wird mit je 1 ccm a) aktiver Exsudatflüssigkeit, b) aktivem Serum eines Meerschweinchens, c) mit Kochsalzlösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert. Die abzentrifugierten Flüssigkeiten werden alle vor dem Versuche  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erhitzt. Die Extrakte a und b riefen bis zu 0,01 ccm herab vollständige, bei 0,005 ccm fast vollständige Granulabildung hervor. Bei 0,001 ccm traten bereits reichlich Vibrionen auf. Der Kochsalzextrakt war nur eine Kleinigkeit schwächer. Inaktiviertes Exsudat und Serum des Meerschweinchens riefen in der Dosis zu 0,1 ccm die Bildung lockerer Granulahaufen, aber neben massenhaften Vibrionen, hervor. Das Meerschweinchenkomplement an sich war fast wirkungslos. — Das Exsudat und das Serum stammten von einem Meerschweinchen, das 24<sup>h</sup> vorher eine ip. Bouilloninjektion erhalten hatte; die Zellen waren durch Zentrifugieren entfernt.

Die Frage nach der Rolle des Komplementes bei der Aufnahme und bei der Abspaltung des Immunkörpers von den Vibrionen ist eine viel zu wichtige, als daß sie durch die bisherigen Versuche als entschieden gelten könnte. Die Resultate genauerer Untersuchungen darüber werden erst später mitgeteilt werden. Klar ist, daß es der Komplementwirkung, d. h. der Granulabildung nicht bedarf, um die gebundenen Immunkörper freizumachen: bei der Digestion sensibilisierter Vibrionen in inaktivem Meerschweinchenserum oder in Kochsalzlösung findet keine Formveränderung und, wie Kulturversuche zeigen, auch keine auffallende Vitalitätsschädigung der Vibrionen statt. Es ist also in gar keiner Weise notwendig, daß der Immunkörper seine Funktion in bezug auf das Komplement ausgeübt haben muß, um erst dann wieder

aktionsfähig zu werden. Das ist zwar kein Beweis gegen die etwaige Fermentnatur des Immunkörpers, spricht aber auch nicht für dieselbe. Es kann sich also bei der Sensibilisierung der Vibrionen nur um eine ganz lockere Aneinanderlagerung von Vibrionen und Serumstoffen handeln, welche schon aus sehr geringfügigen Anlässen wieder auseinandergeht, und dabei ist es eine interessante Frage, warum gerade das Serum, mit welchem sensibilisiert wurde, nicht als Extraktionsmittel für Immunkörper dienen kann. Einige Versuche wurden darüber angestellt, bei denen versucht wurde, die Extraktion mit Kochsalzlösung durch zugesetzte Immunkörper zu beeinflussen.

Versuch L. 5 Agarkulturen Cholera wurden mit je 40 ccm inaktivem (56°) Rinderserum zweimal nacheinander  $\frac{1}{4}$  h bei 42° sensibilisiert. Die in 7 gleiche Teile geteilte gewaschene Vibrionenmasse wurde in folgender Weise 1 h bei 42° behandelt:

1) Cholera + 1 ccm NaCl-Lösung				
2) " + 0,9 " " " + 0,1 ccm aktives Rinderserum				
3) " + 0,9 " " " + 0,1 " inaktives "				
4) " + 0,5 " " " + 0,5 " aktives "				
5) " + 0,5 " " " + 0,5 " inaktives "				
6) " + 0 " " " + 1 " aktives "				
7) " + 0 " " " + 1 " inaktives "				

Von den abzentrifugierten Flüssigkeiten wurden 2, 4 und 6  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erhitzt. Die Extrakte 1, 2, 3 und 4 bildeten in den Dosen 0,1, 0,05, 0,01 und 0,005 ccm ausschließlich oder fast ausschließlich Granula. Die Extrakte 5 und 7 waren so gut wie wirkungslos, indem sich neben geringen Anhäufungen von Granula überall massenhaft Vibrionen fanden. Der Extrakt 6 bildete in den Mengen von 0,1 und 0,05 ccm weit überwiegend Granula, bei 0,01 und 0,005 ccm fanden sich neben vielen Granula bereits zahlreiche Vibrionen. Inaktives Rinderserum, konzentriert und halb verdünnt, zeigte überall vollständige Granulabildung und auch in der Verdünnung 1:10 sehr starke Wirkung.

Versuch LI. 5 Agarkulturen Cholera wurden mit 50 ccm inaktivem (56°) Rinderserum bei 42° sensibilisiert. Die in 5 Teile geteilte gewaschene Vibrionenmasse wurde 1 h bei 42° in folgender Weise behandelt:

1) Cholera + 1 ccm NaCl-Lösung				
2) " + 0,9 " " " + 0,0001 ccm Immunser. (in 0,1 NaCl-Lösg.)				
3) " + 0,9 " " " + 0,001 " " ( " 0,1 " " )				
4) " + 0,9 " " " + 0,01 " " ( " 0,1 " " )				
5) " + 0,9 " " " + 0,1 " " ( " 0,1 " " )				

Die dann abzentrifugierten Flüssigkeiten zeigten sämtlich in den Mengen von 0,1, 0,05, 0,01 und 0,005 ccm vollständige Granulabildung. Das reine Choleraimmunserum zeigte bis zur Menge von 0,00005 ccm noch vollständige Granulabildung, bei 0,00001 ccm traten ganz spärlich Vibrionen



auf, bei 0,000005 ccm vermehrte sich ihre Zahl, um bei 0,000001 ccm die der Granula zu übertreffen. Bei 0,0000005 ccm erlosch die Wirkung des Immunserums fast vollständig.

Da im letztangeführten Versuche die Menge von 0,005 ccm des Extraktes 2 noch absolute Granulabildung herbeigeführt hatte, die entsprechende Menge reinen Immunserums (0,0000005 ccm) also wirkungslos war, so müssen von den sensibilisierten Vibrionen die Immunkörper des Rinderserums trotz Anwesenheit der spezifischen Ambozeptoren abgespalten worden sein. Im Gegensatz dazu verhinderte ein Zusatz von 0,5 ccm inaktivem Rinderserum zur Kochsalzlösung nicht nur jede Immunkörperabspaltung, sondern es muß auch eine Aufnahme von Immunkörpern erfolgt sein, obwohl gerade im Versuch L eine übermäßige Sensibilisierung der verwendeten Vibrionen erfolgt war. Dieses gegensätzliche Verhalten normaler und künstlicher Ambozeptoren verdiente wohl eine eingehendere Untersuchung, welche noch durchgeführt werden soll. Für den Zweck, zu dem die Versuche unternommen werden, läßt sich nur so viel sagen, daß die Anwesenheit desjenigen Immunkörpers, mit dem die Sensibilisierung erfolgt ist, eine Abspaltung der gebundenen Immunkörper zu verhindern scheint, weil immer neue noch aufgenommen werden. Das weiter zu verfolgen, sei vorbehalten, ebenso wie eingehendere Versuche über die Wirkung von Vibrionenrückständen, die durch Behandlung von Cholerakulturen mit aktivem Serum gewonnen sind. Vorläufig sei zu den Bemerkungen, die bereits gelegentlich darüber gemacht wurden, noch folgendes erwähnt:

Der Unterschied in dem Verhalten von Choleravibrionen im aktiven und inaktiven Rinderserum ist schon bei bloßer makroskopischer Betrachtung ein höchst auffälliger. Schwemmt man z. B. je eine Kultur Cholera in 5 ccm aktivem und inaktivem Rinderserum auf, so bilden sich bei ersterer in sehr viel kürzerer Zeit grobe, meist sehr feste Flocken, die rasch zu Boden sinken, während die Agglutination im inaktiven Serum viel langsamer erfolgt und dabei in anfangs viel kleineren, langsamer sich absetzenden und leichter zerteilbaren Flocken erfolgt. Wer diesen Versuch auch nur ein einziges Mal sieht, kann gar nicht im Zweifel darüber sein, daß auch für die Agglutination mindestens durch Normalserum, das Komplement

eine sehr große Rolle spielen muß, auch wenn der schließliche Endeffekt nach längerer Zeit im aktiven und inaktiven Serum der gleiche wird. Die mikroskopische Beobachtung lehrt, wie selbstverständlich, daß die im aktiven Rinderserum gebildeten Flocken etwas ganz anderes sind als die aus inaktivem Serum. Während die letzteren aus zusammengeballten Vibrionen bestehen, welche gar keine oder nur eine sehr zarte Grundsubstanz zwischen und um sich erkennen lassen, bestehen die Flocken, welche das aktive Serum erzeugt, aus einer sehr reichlichen, leicht färbbaren (Karbolfmethylenblau) Grundsubstanz<sup>1)</sup>. Bei kurzem, nicht über 1 Stunde ausgedehntem Aufenthalte bei 37—42° sieht man innerhalb der Grundsubstanz typische Granula, oft noch mit mehr oder minder deformierten Vibrionen gemischt. Behandelt man diese Flocken jetzt ein zweites Mal bei 37—42° mit neuem aktiven Rinderserum, so tritt die Grundsubstanz deutlicher hervor, weil jetzt die in ihr eingesprengten Granula (Vibrionen sind dann nie mehr erhalten) minder dicht liegen; sehr oft haben sie eine etwas unregelmäßige Gestalt angenommen, ein anderer Teil von ihnen ist sehr klein, zu einer Art Granulastaub geworden (sekundäre Cholerastanz). Bei nochmals wiederholter Behandlung mit aktivem Rinderserum enthält die jetzt fast allein zurückbleibende Grundsubstanz fast nur noch solch feinen Granulastaub, oder auch dieser ist in der „tertiären“ Cholerastanz nicht mehr sichtbar. Die Untersuchung dieser Umwandlungsstufen der Vibrionensubstanz hat interessante Resultate gebracht, über welche in Bälde eigens berichtet werden soll, wobei zu bemerken ist, daß die Ausdrücke: sekundäre und tertiäre Cholerastanz nicht bedeuten, daß zu ihrer Entstehung immer eine zwei- oder dreimalige Behandlung von Vibrionen und Vibrionenrückständen mit stets erneutem Serum notwendig sei. Alle diese Umwandlungen können vielmehr schon bei einmaliger Behandlung beobachtet werden, wenn genügend aktives Rinderserum dazu genommen wird und eine entsprechend lange Zeit einwirken kann. Es handelt sich nur um einen bequemen Ausdruck für die einzelnen Etappen des

1) Vergl. darüber namentlich die Paltauf'sche Theorie der Agglutination, sowie Löwit, *Centrabl. f. Bakteriologie*, Bd. 34, Orig.

Verschwindens der geformten Vibrionen zugunsten der Bildung einer neuen, der Grundsubstanz. Bezüglich dieser läßt sich auf indirekte Weise zeigen, daß sie sowohl Anteile der Cholera-substanz als des Serums enthält, beide jedenfalls modifiziert; denn durch Vorbehandlung von Kaninchen erhält man ein Serum, welches sowohl auf Cholera, wie auf Rinder Serum einwirkt.

Vorläufig sei nur erwähnt, daß der Rückstand, welchen man nach Behandlung von Choleravibrionen erhält, ebenfalls geeignet ist, Immunkörper in wirksamer Form abzugeben. Außer früheren Versuchen (Versuche X, XI, XII, XL, XLI etc.), wo das schon hervortritt, seien noch weiter angeführt:

Versuch LII. Eine Agarkultur Cholera wird  $\frac{1}{2}$  h bei  $42^{\circ}$  mit 6 ccm aktivem, frischem Rinder Serum behandelt, wobei in kürzester Zeit stärkste Agglutination eintritt. Der Satz, welcher große Haufen von deutlich erkennbarer Grundsubstanz mit massenhaften Granula und wenigen deformierten Vibrionen enthält, wird gewaschen und mit 2 ccm NaCl-Lösung  $\frac{3}{4}$  h bei  $42^{\circ}$  digeriert. Danach ist die Grundsubstanz deutlicher geworden, zugleich aber lockerer und von einer unregelmäßigen und oft verwischten, netzförmigen Anordnung; sie enthält keine Vibrionen mehr, aber reichliche Granula (Karbomethylenblaufärbung). Nach Abgießen des Extraktes I wird der Satz wieder gewaschen und neuerlich mit 2 ccm NaCl-Lösung  $\frac{3}{4}$  h bei  $42^{\circ}$  extrahiert, was Extrakt II gibt. Der Satz, welcher lockere Grundsubstanz mit sehr feinen Granula enthält, wird wieder gewaschen und mit 6 ccm aktivem Rinder Serum  $\frac{1}{4}$  h bei  $42^{\circ}$  behandelt. Der gewaschene Satz, der nur Grundsubstanz ohne erkennbare Granula mehr enthält, wird zur Gewinnung des Extraktes III wieder mit 2 ccm NaCl-Lösung  $\frac{3}{4}$  h bei  $42^{\circ}$  extrahiert.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt I	Ausschließlich Granula, meist in Haufen	Granula weitaus überwiegend, Vereinzelt freie Vibrionen	Ungefähr gleichviel Granula und Vibrionen
Extrakt II	Granula hie und da zusammen in Haufen; massenhaft freie Vibrionen		Fast nur Vibrionen
Extrakt III	Sehr zahlreiche Granula in Haufen, öfter mit Vibrionen gemischt		Reichlich Granula, meist mit Vibrionen gemischt in Haufen; viel freie Vibrionen
Rinder-serum $56^{\circ}$	Nur Granula in Haufen		Granula in Haufen, mit sehr vielen Vibrionen gemischt
Meerschweinchenkomplement allein: fast nur Vibrionen.			

## Versuch LIII.

- a) 1 Agarkultur Cholera + 10 ccm aktives Rinderserum  $\frac{1}{2}$  h 42°,  
 b) 1 Agarkultur Cholera + 10 ccm inaktives (56°) Rinderserum  $\frac{1}{2}$  h 42°.

Die in a sehr rasch, in b viel langsamer agglutinierende Vibrionemasse wird gewaschen und sodann mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1 h bei 42° extrahiert: Extrakte  $a_1$  und  $b_1$ . Vor der Extraktion bestand der Satz von a aus sehr dichten Haufen von Granula, mit deformierten Vibrionen gemischt, und undeutlicher Grundsubstanz; nach der Extraktion war die Grundsubstanz sehr deutlich und dabei lockerer geworden und enthielt nur sehr zahlreiche Granula eingestreut. Der Satz von b zeigte vor wie nach der Extraktion nur Haufen von Vibrionen mit sehr undeutlicher und zweifelhafter Grundsubstanz. Die gewaschenen Sätze werden neuerlich mit je 2 ccm NaCl-Lösung  $\frac{1}{2}$  h bei 42° extrahiert, was die Extrakte  $a_2$  und  $b_2$  ergibt. Nach neuerlicher Waschung wird den Sätzen je 5 ccm aktives und inaktives Rinderserum zugesetzt, worauf sie  $\frac{1}{2}$  h bei 42° verbleiben. Nach Zentrifugieren und Waschen werden die Sätze zur Gewinnung der Extrakte  $a_3$  und  $b_3$  wieder 1 h bei 42° mit je 1 ccm NaCl-Lösung extrahiert.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt $a_1$	Nur Granula in Haufen		Fast nur Granula; vereinzelte Vibrionen
Extrakt $a_2$	Genau wie Extrakt $a_1$		
Extrakt $a_3$	Nur Granula	Fast nur Granula; ganz spärlich Vibrionen	Etwas mehr Vibrionen, aber Granula weit überwiegend
Extrakt $b_1$	Ausschließlich Granula		
Extrakt $b_2$	Ausschließlich Granula		
Extrakt $b_3$	Nur Granula	Fast nur Granula	wenige freie Vibrionen
Rinderserum 56°	Nur Granula in Haufen		Fast nur Granula; spärlich zerstreute Vibrionen
Meerschweinchenkomplement:	außer einigen lockeren Granulahaufen nur Vibrionen.		

Die Versuche beweisen deutlich, daß auch der Vibrionrückstand nach intensiver Einwirkung aktiven Rinderserums, dem sicherlich eine ganz eigenartige Zusammensetzung aus veränderten Bestandteilen des Serums und der Cholerastanz zukommt, noch wirkungsfähige Immunkörper abzugeben vermag. Ueber die quantitativen, sowie sonstige interessante Verhältnisse bei diesen Versuchen, welche sich zum Teil schon aus den auszugsweise angeführten Beispielen erkennen lassen, soll hier noch nicht gesprochen werden. Sie sollen vielmehr nur einen Uebergang bilden zu Versuchen mit gelöster Cholerastanz, bei denen die Verwendung aktiven Serums zur Einleitung der Präzipitation notwendig ist. Daß Rinderserum in

Bakterienextrakten von genügender Konzentration Niederschläge hervorbringt, wurde von Bail und Weil<sup>1)</sup> beobachtet und von Hoke<sup>2)</sup> genauer untersucht, und später hatten Bail und Hoke<sup>3)</sup> vielfach Gelegenheit, sich mit der Präzipitation von Choleraextrakten durch normales Rinderserum zu beschäftigen. Es geht aber dabei ähnlich wie bei der normalen Agglutination des Rinderserums; wenngleich auch die Präzipitation nach Erhitzung eines Serums auf 56 und 58° noch nachweisbar bleibt, so ist sie doch so abgeschwächt, daß man an der sehr wesentlichen Beteiligung des Komplementes kaum zweifeln kann. Jedenfalls war es für die folgenden Versuche ganz untunlich, mit dem nach Inaktivierung bei 56° übrig bleibenden Reste der Präzipitationskraft zu arbeiten, und alle Versuche sind mit aktivem Serum angestellt. Die Choleraextrakte wurden so gewonnen, daß die ca. 16<sup>h</sup> alte Kulturmasse einer Kolleschen Schale in 12–20 ccm destillierten Wassers oder Kochsalzlösung<sup>4)</sup> abgeschwemmt und die sehr dichte Aufschwemmung mindestens 2<sup>h</sup> auf 60° erhitzt wurde. Hierauf kam sie nach Zusatz einiger Tropfen Toluol in eine Flasche, welche eine Anzahl Porzellankügelchen enthielt. Die Flasche wurde so groß gewählt, daß die Flüssigkeit bis zum Rande reichte, also alle Luft entfernt war. Nach ca. 24<sup>h</sup> kräftigem Schütteln wurde sorgfältig zentrifugiert. Die Extrakte halten sich zwar längere Zeit, doch wurden nie solche, die älter als wenige Tage waren, verwendet.

Versuch LIV. 5 ccm Choleraextrakt wurden mit 10 ccm aktivem Rinderserum bei 42° gefällt. Trübung erfolgte sehr rasch und wurde dicht, doch dauerte es einige Zeit, ehe sie in Flockung übergeht und sich absetzt; nach ca.  $\frac{5}{4}$  h ist dies geschehen, und nun wird zentrifugiert, die oben stehende Flüssigkeit (Abguß) entfernt, das Präzipitat gewaschen und mit 2 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° extrahiert. Als Kontrolle für den „Abguß“ diente Rinderserum, das statt mit Choleraextrakt mit NaCl-Lösung versetzt war und bei 42° stand. Vor dem Versuche wurde es mit dem Abguß  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erhitzt.

1) Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 40, p. 377.

2) Hoke, Wien. klin. Wochenschr., 1907, No. 12.

3) Archiv f. Hygiene, Bd. 64, p. 313.

4) Ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Extrakte mit Wasser oder Kochsalzlösung ließ sich nicht feststellen.

	Ohne Komplement	Mit 0,025 ccm Meerschweinchenserum als Komplement			
	0,1 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß	Nur Häufchen von Vibrionen	Starke Agglutination, nur minimale Granulabildung		Keine Agglutination, keine Granulabildung	
Kontrolle	Nur agglutinierte Vibrionen	Fast nur Granula in Haufen		Viel Granula, daneben mäßig reichlich Vibrionen	
Extrakt	Nur Vibrionen	Ueberwiegende Granulabildung, wenig Vibrionen		Ungefähr gleichviel Granula u. Vibrionen	Vibrionen überwiegend
Rinderserum 56° konzentriert	Nur agglutinierte Vibrionen	Fast genau wie im Extrakt			
Meerschweinchenkomplement allein: Fast nur Vibrionen.					

Ein angeschlossener bakterizider Plattenversuch, bei dem inaktives Rinderserum als Kontrolle und je 0,05 ccm Meerschweinchenserum als Komplement verwendet wurde, ergab:

	von Extrakt	von inaktivem Rinderserum
0,005 ccm	75 000	30 000
0,01 „	20 000	25 000
0,05 „	20 000	10 000
0,1 „	15 000	8 000

Die Einsaat betrug ca. 400 000 Keime. Die Kontrolle mit Meerschweinchenkomplement allein ergab eine höhere Kolonienzahl.

Ein Versuch, betreffend die präzipitierende Wirkung des Präzipitatextraktes, hatte folgendes Ergebnis:

0,5 ccm Präzipitatextrakt + 0,5 ccm Choleraextrakt:  $\emptyset$   
 0,5 „ „ + 0,5 „ Meerschweinchenserum: 0 oder ?  
 0,5 „ „ + 0,5 „ „ + 0,5 ccm Choleraextrakt: deutliche Satzbildung (beobachtet nach 15<sup>h</sup> Aufenthalt bei 37°).

Versuch LV. Es werden hergestellt:

- I. 1 Agarkultur Cholera + 6 ccm aktives Rinderserum,
- II. 3 ccm Choleraextrakt + 6 „ „ „

Die Proben bleiben 1<sup>h</sup> bei 42°, wobei in I. vollständige Agglutination, in II. vollständige Präzipitation eintritt. Die Sätze werden gewaschen und mit je 2 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° extrahiert. Dann wird abzentrifugiert und die Sätze nochmals mit 2 ccm, dann ein drittes Mal mit ebensoviel NaCl-Lösung immer 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert. Daraus ergeben sich die Vibrionenextrakte I—III und Präzipitatextrakte I—III.

		Ohne Komplement	Mit 0,025 ccm Meerschweinchenserum als Komplement		
		0,1 ccm	0,1 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm
Vibrionenextrakt I	Nur Vibrionen	Nur Granula	Ungefähr $\frac{1}{2}$ Granula	} Ausschließlich oder fast ausschließlich Vibrionen	
„	II Nur Vibrionen	Nur Granula	ca. $\frac{1}{2}$ Granula		
„	III Nur Vibrionen	Granula, nur vereinzelt Vibrionen	Fast nur Vibrionen		
Präzipitalextrakt I	Nur Vibrionen	Massenhaft Granula, vereinzelt Vibrionen	ca. $\frac{1}{3}$ Granula		
„	II Nur Vibrionen	Fast nur Granula	Granula zahlreich, aber überwiegend Vibrionen		
„	III Nur Vibrionen	Granula zahlreich in Haufen, daneben Vibrionen	Sehr spärlich Granula, Vibrionen		
Meerschweinchenkomplement: Wenig nur Vibrionen.			Granula in lockeren Haufen, sonst		

Versuch LVI. Es werden hergestellt:

- I. 2 Agarkulturen Cholera + 20 ccm aktiven Rinderserums  
 II. 10 ccm Choleraextrakt + 20 „ „ „

Nach 1<sup>h</sup> bei 42° ist in I vollständige Agglutination, in II vollständige Präzipitation eingetreten. Die Bodensätze werden in je 2 gleiche Teile geteilt, gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung in folgender Weise digeriert:

- |                       |                     |                    |  |
|-----------------------|---------------------|--------------------|--|
| a) Vibrionenrückstand | + 1 ccm NaCl-Lösung | 1 <sup>h</sup> 42° | } Flüssigkeiten durch Zentrifugieren gewonnen. |
| b) „                  | + 1 „               | 1 <sup>h</sup> 65° |  |
| c) Präzipitat         | + 1 „               | 1 <sup>h</sup> 65° |  |
| d) „                  | + 1 „               | 1 <sup>h</sup> 65° |  |

Ein Teil der Extrakte a und c wird nachträglich 1<sup>h</sup> auf 65° erhitzt.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt a	Nur Granula, fast durch- aus in Haufen	Weit überwiegend Granula, spärlich Vibrionen zer- streut	
Extrakt a 65°	} Spärlich Granula in lockeren Haufen, massenhaft Vi- brionen		
Extrakt b			
Extrakt c	Nur Granula, fast durch- aus in Haufen	Weitaus überwiegend Gra- nula, spärlich Vibrionen	
Extrakt c 65°	} Selten Granula in lockeren Haufen, massenhaft Vibrionen		
Extrakt d			
Rinderserum 56°	Nur Granula in Haufen		
Rinderserum 65°	Spärlich lockere Granulahaufen, sonst nur Vibrionen		
Meerschweinchenkomplement allein: Außer einigen lockeren Granulahaufen nur Vibrionen.			

Andere Versuche mit Präzipitaten werden weiter unten angeführt, aber schon aus den mitgeteilten geht hervor, daß auch Präzipitate bei entsprechender Digestion bakteriolytisch wirksame Immunkörper abgeben, unter den gleichen Bedingungen, wie sie früher für sensibilisierte Vibrionen ermittelt wurden.

Es ist schon oben erwähnt worden, daß dieses Freiwerden von bakteriziden Immunkörpern außerordentlich zugunsten einer einheitlichen Auffassung der Serumaktivität spricht. Wenn im Serum eigene Präzipitine vorhanden sind, also Stoffe, welche sich eigenartig gegen gelöste Bakteriensubstanz richten, so ist nicht recht einzusehen, wieso die Behandlung eines Serums mit geformter Bakteriensubstanz, also in unserem Falle mit Vibrionen, diese Präzipitine wegnehmen soll. So folgerten bereits Bail und Hoke aus früheren Versuchen. Wenn sich jetzt überdies zeigen läßt, daß Präzipitate, also die vorläufigen Endprodukte der Reaktion zwischen Serum und gelöster Vibrionensubstanz, bakteriolytische Immunkörper abgeben können, so ist die Folgerung berechtigt, zum mindesten aber einer Prüfung wert, daß bei allen Reaktionen, welche zwischen Serum und Vibrionensubstanz stattfinden können, immer nur ein und derselbe Immunkörper in Tätigkeit trete. Je nach der Form, in welcher die Bacillensubstanz vorliegt, und je nach der Beschaffenheit des Serums (Menge der Immunkörper, Komplementgehalt und gegenseitige quantitative Beziehungen beider) tritt dann diese oder jene Seite der Serumaktivität als Agglutination, Präzipitation oder Bakteriolyse in Erscheinung. Im Grunde genommen, ist die Theorie dreier Serumwirkungen *sui generis* schon durch die Paltauf'sche Agglutinationshypothese durchbrochen worden, welche einen engen Zusammenhang zwischen Agglutination und Präzipitation annimmt.

Der Einwand, daß bei einem Fällungsvorgange sehr leicht aktive Stoffe einfach mitgerissen und dann wieder abgegeben werden, muß dabei berücksichtigt werden. Gegen ihn spricht zunächst, daß man aus einem Rinderserum nicht nur die bakteriolytische Wirkung durch Präzipitation entfernen kann, sondern auch umgekehrt die präzipitierende durch Behandlung mit Bakterien. Ferner kann man ein Präzipitat waschen,



ohne daß es deswegen bakteriolytische Immunkörper abgibt; solche werden vielmehr erst dann frei, wenn die gleichen Bedingungen hergestellt werden, welche die Abgabe von Immunkörpern durch sensibilisierte Vibrionen zulassen. Am wichtigsten aber dürfte die Beobachtung sein, daß bei Immunkörperabgabe sowohl seitens sensibilisierter Vibrionen, wie von Präzipitaten eine unzweifelhafte, wenn auch keineswegs absolute Spezifität zu konstatieren ist, indem mit Rinderserum behandelte Cholera-vibrionen, sowie Präzipitate aus Choleraextrakten vorwiegend Immunkörper, die gegen Cholera gerichtet sind, nicht aber gegen andere Bakterien, abgeben.

Versuch LVII. Es wurden hergestellt:

- |    |  |   |
|----|--|---|
| 1) | 1 Kultur Cholera in 5 ccm NaCl-Lösung + 10 ccm inakt. (56°) Rinderser. | $\left. \begin{array}{l} 42^{\circ} \\ 11 \end{array} \right\}$ |
| 2) | 1 „ Typhus „ 5 „ „ + 10 „ „ „ „  |   |
| 3) | 5 ccm Choleraextrakt „ + 10 „ aktives „                                |   |
| 4) | 5 „ Typhusextrakt „ + 10 „ „ „   |   |
| 5) | 5 „ NaCl-Lösung „ + 10 „ inaktives „                                   |   |

Die Agglutination erfolgt bei Typhusbacillen schneller als bei Cholera-vibrionen; umgekehrt ist die Präzipitation in Choleraextrakt früher vollständig als im Typhusextrakt. Die Bodensätze werden gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert.

Zum Versuche wurden einerseits die nach der Sensibilisierung und Präzipitation abgegossenen Serumverdünnungen, von denen die von 3 und 4 vorher  $\frac{1}{3}$  bis 56° inaktiviert wurden, andererseits die Kochsalzextrakte (Abguß 1—5 und Extrakt 1—5) verwendet.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Abguß 1	Sehr reichlich Vibrionen diffus zerstreut, überdies Haufen, welche gemischt Granula und Vibrionen enthalten		Fast nur Vibrionen
Abguß 2	Meistens Granula in Haufen, Vibrionen nur in geringer Zahl, mit Granula zusammen agglutiniert		Etwas reichliche Vibrionen, aber Granula in Uebersahl
Abguß 3	Granula in geringer Zahl mit Vibrionen zusammen in Haufen, viel freie Vibrionen	Wenig Granula in Vibrionen	Haufen, massenhaft
Abguß 4	Granula überwiegen weitaus, fast nur in Haufen, öfters mit Vibrionen in geringer Zahl gemischt		Granula noch überwiegend, Vibrionen meist agglutiniert
Kontrolle 5	Ausschließlich oder fast ausschließlich		Granula in Haufen
Extrakt 1	Nur Granula, meist in Haufen		Fast nur Granula in Haufen, vereinzelt Vibrionen
Extrakt 2	Ziemlich zahlreich Granula neben vielen freien Vibrionen	Sehr reichlich Vibrionen, wenig Granula in Haufen	Granulabildung sehr gering, massenhaft Vibrionen

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt 3	Nur Granula	Fast nur Granula, sehr spärlich Vibrionen	Granula weit in Ueberzahl, Vibrionen zerstreut
Extrakt 4	Wenige Granula, mit Vibrionen gemischt in Haufen, sehr reichlich Vibrionen		Granula ganz vereinzelt, massenhaft Vibrionen

Rinderserum 56° Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula in Haufen  
 Meerschweinchenkomplement: Wie gewöhnlich, bis auf einige lockere Granulahaufen nur Vibrionen.

Versuch LVIII. Es werden hergestellt:

- 1) 6 ccm Choleraextrakt + 12 ccm aktives Rinderserum
- 2) 6 „ Typhusextrakt + 12 „ „ „
- 3) 6 „ NaCl-Lösung + 12 „ „ „

Die während 1<sup>h</sup> bei 42° gebildeten Präzipitate werden abzentrifugiert, gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° extrahiert. Außer den so gewonnenen Extrakten 1 und 2 werden die Abgüsse von den Präzipitaten verwendet, nachdem sie wie die Kontrolle 3 1/2<sup>h</sup> auf 56° erhitzt worden waren.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Abguß 1	Massenhaft Vibrionen, meist agglutiniert, wenige Granula mit Vibrionen zusammen in Haufen		Fast nur freie Vibrionen
Abguß 2	Keine wesentliche Differenz gegenüber Abguß 1		
Kontrolle 3	Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula in Haufen		
Extrakt 1	Weitaus überwiegend Granula meist in Haufen, spärliche Vibrionen		Granula noch stark in Ueberzahl, etwas mehr Vibrionen als vorher
Extrakt 2	Massenhaft überall Vibrionen, Granula in lockeren Haufen		Granula selten und zerstreut

Rinderserum 56° Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula  
 Meerschweinchenkomplement: Wie gewöhnlich.

Ein bakterizider Versuch mit den gleichen Extrakten bei sehr hoher (∞) Cholera- und Typhuseinsaat hatte folgendes Resultat:

			Cholera-einsaat	Typhus-einsaat
0,05 ccm Meersch.-Ser.	+ 0,1 ccm NaCl-Lösung		∞	∞
0,05 „	+ 0,01 „ Extrakt 1		60 000	∞
0,05 „	+ 0,05 „ „ 1		16 300	∞
0,05 „	+ 0,1 „ „ 1		9 800	∞
0,05 „	+ 0,01 „ „ 2		∞	120 000
0,05 „	+ 0,05 „ „ 2	ca. 100 000	17 000	
0,05 „	+ 0,1 „ „ 2	460 000	12 000	
0,05 „	+ 0,01 „ Rinderser. 56°	12 000	3 600	
0,05 „	+ 0,05 „ „	14 000	10 800	
0,05 „	+ 0,1 „ „	2 000	9 700	

Versuch LIX. Es werden hergestellt:

- 1) 1 Kultur Cholera + 10 ccm inaktives (56°) Rinderserum
- 2) 1 „ Typhus + 10 „ „ „
- 3) 1 „ Vibrio XI + 10 „ „ „

Während 1<sup>h</sup> Aufenthaltes bei 42° tritt überall vollständige Agglutination ein, bei Typhus und Vibrio XI schneller als bei Cholera. Die Proben werden zentrifugiert, die Abgüsse 1—3 zurückbehalten, die Bodensätze gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm
Abguß 1	Granula mit Vibrionen gemischt in Haufen. Daneben Haufen von normalen Vibrionen		Spärlich Granula, massenhaft Vibrionen	
Abguß 2	Fast nur Granula in Haufen	Granula u. Vibrionen in Haufen gemischt. Wenig freie Vibrionen	Weniger Granula, zunehmende Zahl freier Vibrionen	
Abguß 3	Meist Granula in Haufen. Freie Vibrionen vorhanden, aber nicht zahlreich		Zunehmende Zahl freier Vibrionen	Freie Vibrionen überwiegend
Rinderserum 56° Bis zur letzten Dosis herab fast nur Granula in Haufen				

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Extrakt 1	Ausschließlich Granula in Haufen		Fast nur Granula in Haufen, wenig freie Vibrionen	
Extrakt 2	Wenig Granula mit Vibrionen gemischt in Haufen, massenhaft freie Vibrionen		Sehr spärliche Granulabildung; massenhaft Vibrionen	
Extrakt 3	Granula nur mit Vibrionen gemischt in Haufen, massenhaft freie Vibrionen		Außer vereinzelt zerstreuten Granula nur Vibrionen	

Meerschweinchenkomplement: Wie gewöhnlich.

Versuch LX. Es werden hergestellt:

- 1) 1 Kultur Cholera + 10 ccm inaktives (56°) Rinderserum
- 2) 1 „ Vibrio El Tor + 10 „ „ „
- 3) 1 „ Vibrio XI + 10 „ „ „
- 4) 1 „ Vibrio Elvers + 10 „ „ „

Anordnung wie im vorigen Versuche.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß 1	Haufen, in denen Vibrionen und Granula gemischt sind, daneben einzelne Granula und sehr viel Vibrionen	Wenig Granula in Haufen, massenhaft Vibrionen	Fast nur Vibrionen
Abguß 2	Ziemlich genau wie Abguß 1		
Abguß 3	Sehr viel Granula, teils in Haufen, teils einzeln, wenig Vibrionen	Sehr viel Granula, meist in Haufen, neben ziemlich vielen freien Vibrionen	

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß 4	Fast nur Granula in Haufen	Zunehmende Zahl freier Vibrionen neben sehr vielen, meist in Haufen liegenden Granula	
Rinderserum 56 °	In allen Dosen nur Granula in Haufen.		
	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt 1	Ueberall nur Granula in Haufen		
Extrakt 2	Ausschließlich Granula in Haufen		
Extrakt 3	Vereinzelte Haufen, in denen Granula und Vibrionen gemischt sind, sonst massenhaft Vibrionen	Fast nur Vibrionen	
Extrakt 4	Genau wie Extrakt 3.		
Meerschweinchenkomplement:	Fast nur Vibrionen.		

## Versuch LXI. Es werden hergestellt:

- 1) 1 Kultur Cholera + 10 ccm inaktives (56°) Rinderserum
- 2) 1 „ Typhus + 10 „ „ „
- 3) „ „ + 10 „ „ „
- 4) 3,5 ccm Choleraextrakt + 10 „ aktiv. Rinderser. + 1,5 ccm NaCl-Lösung
- 5) 5 „ Typhusextrakt + 10 „ „ „
- 6) 5 „ NaCl-Lösung + 10 „ „ „

Anordnung wie im vorigen Versuche.

## a) Tierversuch.

Ein Meerschweinchen erhielt 0,1 ccm von Extrakt 1 mit  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera ip.

Schon nach  $\frac{1}{4}$  h finden sich nur Granula. Das Tier überlebt ohne besondere Krankheit.

Ein Meerschweinchen erhielt 0,1 ccm von Extrakt 2 mit  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera ip.

Nach  $\frac{1}{2}$  h und 1 h sind vereinzelte Granula neben massenhaften Vibrionen zu finden. Das Tier stirbt an fortschreitender Vibrionenvermehrung in der Nacht.

Ein Meerschweinchen erhält 0,1 ccm Extrakt 4 mit  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera ip.

Nach  $\frac{1}{4}$  h ist die Granulabildung noch gering, nach  $\frac{1}{2}$  h sind größtenteils, nach 1 h ausschließlich Granula zu finden. Das Tier überlebt ohne besondere Krankheit.

Ein Meerschweinchen erhält 0,1 ccm Extrakt 5 mit  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera ip.

Nach  $\frac{1}{4}$  h bis zu 1 h sind einzelne Granula immer neben massenhaften Vibrionen zu finden. Die fortschreitende Vibrionenvermehrung tötet das Tier in der Nacht.

Ein Meerschweinchen erhält als Kontrolle nur  $\frac{1}{8}$  Kultur Cholera und stirbt unter fortschreitender Vibrionenvermehrung in der Nacht.

## b) Mikroskopischer Versuch.

	0,05 cem	0,01 cem	0,005 cem
Abguß 1	Fast nur Vibrionen in kleinen Häufchen, selten Granula	Fast nur Vibrionen ohne Agglutination	
Abguß 2	Granula in großen Haufen, wenige zerstreute Vibrionen	Etwas mehr Vibrionen, aber Granula überwiegend	Ueberwiegend Vibrionen
Kontrolle 3	Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula		
Abguß 4	Nur in den höchsten Dosen geringe Granulabildung, sonst nur Vibrionen		
Abguß 5	Reichliche Granulabildung; wenige zerstreute Vibrionen	Ueberwiegend Granula bei zunehmender Zahl von Vibrionen	Vibrionen überwiegend
Kontrolle 6	Nur Granula	Fast nur Granula, wenige Vibrionen	Granula noch überwiegend
	0,1 cem	0,05 cem	0,01 cem
Extrakt 1	Nur Granula	Fast nur Granula	Granula weit überwiegend
Extrakt 2	Ueberall fast nur Vibrionen		
Extrakt 4	Fast nur Granula, einzelne Vibrionen	Granula weitaus in Ueberzahl	Granula noch überwiegend
Extrakt 5	In allen Proben fast nur Vibrionen		
Meerschweinchenkomplement: Fast nur Vibrionen.			

c) Bakterizider Plattenversuch bei einer Aussaat von ca. 500 000 Keimen, mit 0,05 cem Meerschweinchenserum als Komplement, welches allein auf der nach 4h angelegten Platte ca. 500 000 Keime lieferte.

	Extrakt 1	Extrakt 2	Extrakt 4	Extrakt 5	Inaktives Rinderserum
0,01 cem	15 000	} über 500 000	13 000	300 000	12 000
0,05 „	9 000		6 000	200 000	18 000
0,1 „	12 000		12 000	45 000	3 200

Versuch LXII. (Auszugsweise wiedergegeben.) Je 1 Kultur von Cholera Pfeiffer, Cholera 74, Vibrio El Tor, Vibrio Elvers, Vibrio XI, Vibrio 6 und Typhus wurden mit je 10 cem inaktivem Rinderserum in der gewöhnlichen Weise sensibilisiert, die gewaschenen Bodensätze wurden mit je 1 cem NaCl-Lösung 1h bei 37° extrahiert. Die Extrakte waren fast oder ganz wirkungslos, bis auf den von Cholera Pfeiffer und Vibrio El Tor, welche in den Mengen von 0,1, 0,05 und 0,01 cem ausschließlich oder fast ausschließlich Granula lieferten. Der Extrakt von Cholera 74 ergab in den Mengen von 0,05 und 0,01 cem fast vollständige oder weit überwiegende Granulabildung, in der Dosis 0,1 cem jedoch agglutinierte Vibrionen (Andeutung einer Komplementablenkung?).

Versuch LXIII. Es werden hergestellt:

1) 5 ccm Extrakt von Cholera Pfeiffer	} + 10 ccm aktives Rinderserum
2) 5 " " " Vibrio XI	
3) 5 " " " Typhusbacillen	
4) 5 " " " Colonbacillen	
5) 5 " NaCl-Lösung	

Die von den Präzipitaten nach 1<sup>h</sup> Aufenthalt bei 42° befreiten Abgüsse werden vor ihrer Verwendung  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erwärmt. Die gewaschenen Präzipitate werden mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß 1	Granula und Vibrionen gemischt in Haufen	Wenig Granula in Haufen, massenhaft Vibrionen, oft agglutiniert	Spärlich Granula, massenhaft Vibrionen	
Abguß 2	Granula und Vibrionen, meist gemischt in großen Haufen		Reichlich Granula neben sehr vielen Vibrionen	
Die Abgüsse 3, 4 und Kontrolle 5 zeigen ausschließlich oder überwiegend Granulabildung.				
Extrakt 1	Nur Granula in Haufen	Fast nur Granula, selten Vibrionen	Weitaus überwiegend Granula	—
Extrakt 2	Granula neben massenhaften Vibrionen	Wenige Granula nur in kleinen Haufen, massenhaft Vibrionen		
Extrakt 3 und 4 zeigen ganz geringe Granulabildung bei massenhaften Vibrionen.				
Inaktiviertes Rinderserum bildete bis zu 0,01 ccm herab ausschließlich Granula, bei 0,005 ccm überwogen noch die Granula sehr, bei 0,001 ccm waren Vibrionen und Granula an Zahl gleich.				
Meerschweinchenkomplement war so gut wie wirkungslos.				

Versuch LXIV. Zu 10 ccm inaktivem Rinderserum werden zunächst 2 Agarkulturen von Typhus angesetzt, welche bei 42° rasch und vollständig agglutiniert werden. Das abzentrifugierte Serum wird sodann nochmals mit 2 Agarkulturen von Typhus vermischt, bei denen nur noch eine sehr unvollständige Agglutination stattfindet. Nach gründlichem Zentrifugieren dieses erschöpften Serums wird zu 5 ccm desselben eine Choleraagarkultur zugesetzt, ebenso eine gleich üppige zu 5 ccm normalem inaktivierten Rinderserum. In beiden Proben erfolgt bei 42° rasche Agglutination. Als Kontrolle wird überdies eine Aufschwemmung von 1 Agarkultur Typhus mit 5 ccm normalem inaktiven Rinderserum bei 42° gehalten. Die abzentrifugierten Bodensätze werden gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert. Somit ergeben sich zur Untersuchung: Extrakt 1 aus Vibrionen, die mit typhuserschöpftem Rinderserum sensibilisiert waren; Extrakt 2 aus mit Normalserum sensibilisierten Vibrionen; Extrakt 3 aus Typhusbacillen, welche mit Normalrinderserum sensibilisiert waren. Ferner 3 Abgüsse, und zwar: Abguß 1, Rinderserum nach Be-

handlung mit 4 Typhuskulturen; Abguß 2, Rinderserum nach Behandlung mit 4 Typhus- und 1 Cholerakultur; Abguß 3, Rinderserum nach Behandlung mit 1 Cholerakultur.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Extrakt 1	Wenige Granula in Haufen, massenhaft Vibrionen, auch vereinzelte Typhusbac.	Granula zerstreut, aber nicht selten. Massenhaft Vibrionen und Typhusbacillen	
Extrakt 2	Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula in Haufen		
Extrakt 3	Viel Granula in Haufen, daneben freie Vibrionen	Wenig Granulabildung, massenhaft Vibrionen	
Abguß 1	In allen Proben zahlreiche Granula in Haufen, daneben freie Vibrionen und Typhusbacillen; jedenfalls noch eine starke Wirkung auf Vibrionen		
Abguß 2	Vibrionen stark agglutiniert, in kleinen Haufen; dabei spärliche Granulabildung; auch Typhusbacillen	Massenhaft freie Vibrionen	
Abguß 3	Wie Abguß 2.		

Inaktives Rinderserum: Ausschließlich oder fast ausschließlich Granula  
Meerschweinchenkomplement: Fast nur Vibrionen.

Versuch LXXV. Es werden hergestellt:

- 1) 1 Kultur Cholera + 10 ccm inaktives Rinderserum,
- 2) 3 Kulturen Vibrio XI + 10 ccm inaktives Rinderserum.

Die 3 Kulturen von Vibrio XI werden nacheinander so zugesetzt, daß erst 2 Kulturen in 10 ccm Serum aufgeschwemmt werden; nachdem Agglutination eingetreten war und sich die größten Flocken bereits abgesetzt hatten, wurde in ca. 5 ccm der oben stehenden Flüssigkeit neuerdings 1 Kultur verteilt und die Aufschwemmung mit dem Reste vereint. Dann fand etwas langsamer, aber vollständig die Agglutination der ganzen Bakterienmasse bei 42° statt. Die abzentrifugierten Bodensätze wurden gewaschen und mit je 1 ccm Na-Cl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° extrahiert.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß 1	Selten Granula. Vibrionen in kleinen Häufchen	Neben agglutinierten auch freie Vibrionen	Fast nur freie Vibrionen	
Abguß 2	Viel Granula in Haufen und einzeln spärlich Vibrionen, oft gequollen		Zunehmende Zahl freier Vibrionen, neben sehr vielen Granula	
Inaktives Rinderserum	Nur Granula in Haufen		Fast nur Granula, einzelne Vibrionen	
Extrakt 1	Nur Granula in Haufen		Fast nur Granula in Haufen und einzeln	
Extrakt 2	Ausschließlich oder fast ausschließlich Vibrionen			

Meerschweinchenkomplement: Fast nur Vibrionen.

Die Versuche verliefen fast alle (im ganzen wurden mit verschiedenen Modifikationen 22 angestellt) vollkommen eindeutig. Aus Rinder Serum, welches auf alle choleraähnlichen Vibrionen und auch auf Typhusbacillen u. s. f. sehr stark einwirkt, also eine hohe, aber nicht spezifische Aktivität besitzt, lassen sich durch Behandlung mit Choleravibrionen und geeignete Extraktion derselben Flüssigkeiten mit einer spezifischen Bakteriolyse für Cholera gewinnen. Die Spezifität ist keine absolute; darin weichen die Versuchsergebnisse mehrfach voneinander ab, daß in dem einen Versuche nur die Extrakte aus sensibilisierten Choleravibrionen für Cholera bakteriolytisch waren, in anderen auch die Extrakte aus anderen Vibrionen und Bakterien. In letzterem Falle war aber auch immer eine quantitative Spezifität so unverkennbar, daß das Hauptresultat, die Gewinnung spezifisch auf Cholera wirksamer Flüssigkeiten aus einem nicht spezifischen Normalserum mit Hilfe von Choleravibrionen, feststeht. Als sehr beweisend möchten wir dafür besonders hervorheben, daß von allen untersuchten choleraähnlichen Vibrionen nur der *Vibrio El Tor* auch für echte Choleravibrionen wirksame Extrakte gab. Gerade für diesen *Vibrio* ist aber bekannt, daß er sich in bezug auf sein Verhalten bei der Bakteriolyse wie ein echter Choleravibrio verhält und wahrscheinlich auch als solcher betrachtet werden muß.

Es gelingt nicht allein, durch Behandlung von Rinder Serum mit intakten Choleravibrionen, sondern auch mit gelöster Vibrionensubstanz (Choleraextrakten), bakterizide Flüssigkeiten mit der gleichen beschränkten, aber unverkennbaren Spezifität zu gewinnen. Dadurch ist der Einwand widerlegt, daß durch den Präzipitationsvorgang einfach mechanisch ein Mitreißen der bakteriolytischen Immunkörper stattfindet. Es wäre nicht einzusehen, warum gerade die für Cholera passenden Immunkörper durch die Präzipitation von Choleraextrakt physikalisch mitgerissen werden.

Die Frage, die sofort entsteht, ist nun, wieso die Gewinnung spezifischer Extrakte aus nicht spezifischem Serum zu erklären ist. Einfach ist die Beantwortung, sobald man mit Ehrlich annimmt, daß von vornherein auch im normalen Serum verschiedene Immunkörper vorkommen, solche, welche



auf Choleravibrionen, auf Typhusbacillen u. s. f. einwirken können. Dann ist es eigentlich ganz selbstverständlich, daß Choleravibrionen eben nur die zugehörigen Immunkörper aus dem Serum nehmen und nachträglich wieder abgeben. Die Versuche, von denen oben eine ganze Anzahl mitgeteilt ist, sprechen durchaus zu gunsten dieser Anschauung. Ein Rinder-serum, das mit Typhusbacillen, selbst im Uebermaße, behandelt ist (Versuch LXIV), besitzt noch immer nachweisbare Wirkung auf Choleravibrionen, ist geeignet, sie zu sensibilisieren, und aus den so sensibilisierten Vibrionen kann man wirksame Digestionsflüssigkeiten gewinnen. Bei der Präzipitation mit Bakterienextrakten sind die Verhältnisse ganz analoge.

Und doch kann man sich bei genauer Beschäftigung mit normalem Serum nur schwer dieser Anschauung anschließen. Es ist dabei merkwürdig, daß ein immunkörperreiches Serum, wie das Rinder Serum, für alle Bakterien, die überhaupt für Reagenzglasversuche gut geeignet sind, so stark wirksam ist, ein immunkörperarmes, wie z. B. das Meerschweinchenserum, für alle so wenig aktiv. Das Bürgische<sup>1)</sup> Gesetz mag mancher Ausnahme unterworfen sein, im ganzen ist es gewiß richtig, gilt nicht nur für die Agglutination, sondern für die Serumaktivität überhaupt, und dann ist eigentlich kein Grund einzusehen, wieso das Rind für verschiedene Bakterien so relativ gleichmäßig reich an den verschiedenen Immunkörpern sein soll. Es erscheint durchaus berechtigt, zu versuchen, ob sich die spezifische Absorption der normalen Immunkörper nicht anders als durch die Annahme vieler von vornherein verschiedener Immunkörper erklären läßt.

Ob ein solcher Versuch gelingen wird, läßt sich noch nicht entscheiden. Jedenfalls aber regen die mitgeteilten Experimente zu einem Vergleiche mit der spezifischen Immunisierung eines Tieres an. Was dabei entsteht, ist eine oft ungeheure Anhäufung von bakteriolytischen und sonstigen Antikörpern im Blute von ausgesprochener Spezifität. Wie immer man nun auch die mitgeteilten Versuche erklären will, jedenfalls geben sie einen Fingerzeig für die Ausbildung

---

1) Arch. f. Hygiene, Bd. 62, p. 239 ff.; dazu: Hirschfeld, ebenda, Bd. 63, p. 237 ff., und Mamlock, ebenda, 1908, Bd. 68, p. 95 ff.

spezifischer Blutwirkungen ab. Denn der einmal in Aktion getretene normale Immunkörper verschwindet ja bei der Reaktion nicht, er bleibt aktionsfähig, und zwar vorwiegend nur für Cholera. Auch dann, wenn sich nur der normale Immunkörper wieder ersetzt, muß das Versuchstier einen erhöhten Antikörpergehalt erlangen, ohne daß man deswegen den Prozeß anderswohin als in die Körpersäfte verlegen muß. Daß die Reagenzglasversuche sich in diesem Falle auf die Verhältnisse des lebenden Tieres übertragen lassen, beweist die Tatsache, daß die Abspaltung gebundener Immunkörper von sensibilisierten Vibrionen in der Meerschweinchenbauchhöhle mindestens ebensogut wie in der Epruvette erfolgt.

Wenn nun überdies, wie bereits weit fortgeführte Versuche erkennen lassen, das Reaktionsprodukt zwischen Cholera-substanz und Serum selbst noch als Antigen weiterwirken kann, so wird auch das quantitative Verhältnis zwischen Menge des zur Immunisierung eingeführten Antigens und Menge der schließlich erhaltenen Antikörper verständlicher. Doch soll in dieser Abhandlung auf eingehendere Besprechung der weiteren Folgerungen aus den Versuchen, welche mit Notwendigkeit zu einer neuen Anschauung über Antikörperbildung führen müssen, noch nicht eingegangen werden.

Auch bei Verwendung von Serum, welches bei weitem nicht so reich an normalen Choleraimmunkörpern wie das Rinderserum ist, gelingt es, die vorhandenen mit Hilfe von Vibrionen zu isolieren. Hauptsache für das Gelingen solcher Versuche ist es, das richtige Mengenverhältnis zwischen Serum und Vibrionen zu treffen.

Versuch LXVI. 15 ccm inaktives (56°) Kaninchenserum wurden mit einer schwachen Kultur Cholera versetzt und bei 42° gehalten, bis deutliche Agglutination eingetreten war. Die Probe wurde sodann zentrifugiert, das obenstehende Serum (Abguß) entfernt, der Bodensatz gewaschen und mit 1 ccm NaCl-Lösung 1<sup>h</sup> bei 42° digeriert.

	0,2 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Abguß	Fast nur Vibrionen, sehr selten lockere Granulahaufen		Nur Vibrionen	
Extrakt	Granula und Vibrionen gemischt; mehr Granula als Vibrionen		Ungefähr gleichviel Granula und Vibrionen	Granula reichlich, aber Vibrionen überwiegen

	0,2 cem	0,1 cem	0,05 cem	0,01 cem
Kaninchen- serum	In den Präparaten ist nur wenig zu sehen; was vor- handen ist, sind Vibrionen		Fast nur Vibrionen	

Meerschweinchenkomplement: Bis auf einzelne lockere Granulahaufen nur Vibrionen.

Der bakterizide Plattenversuch mit 0,05 cem Meerschweinchenserum als Komplement hatte folgendes Ergebnis, bei einer Einsaat  $\infty$ .

	Extrakt	Inaktives Kaninchen- serum
0,01 cem	50 000	34 000
0,05 „	18 000	26 000
0,1 „	8 200	12 000
0,2 „	13 000	0

Meerschweinchenkomplement allein:  $\infty$ .

Versuch LXVII. In 24 cem inaktivem (56") Kaninchen-  
serum wurde eine Kultur Cholera verteilt, welche bei 42° vollständig agglutiniert wurde. Nach Zentrifugieren und Entfernung des Serums (Abguß) wurde der Bodensatz gewaschen und 1h bei 42° mit 1 cem NaCl-Lösung digeriert.

	0,2 cem	0,1 cem	0,05 cem	0,1 cem
Abguß	Ausschließlich Vibrionen, meist in kleinen Häufchen		Nur Vibrionen, selten in Häufchen	
Extrakt	Massenh. Granula neben mäßig vielen Vibrionen		Fast nur Granula. Vibrionen fehlen oder sind selten, viel weniger als bei 0,2 cem (Komplementablenkung?)	
Inakt. Kanin- chenserum	Wenig Granulabildung. Vi- brionen meist agglutiniert		Fast nur Vibrionen ohne Agglutination	

Meerschweinchenkomplement: Wie gewöhnlich.

Der bakterizide Plattenversuch mit 0,05 cem Meerschweinchenserum als Komplement, das bei der geringen Einsaat von 9520 Keimen eine Vermehrung auf 230 000 zuließ, ergab:

	Abguß	Extrakt	Inaktives Kaninchen- serum
0,2 cem	$\infty$	376	$\infty$
0,1 „	$\infty$	96	$\infty$
0,05 „	$\infty$	7	$\infty$

Anhangsweise sei noch einiger Versuche über die präzipitierende Wirkung von Kochsalzextrakten aus sensibilisierten Vibrionen und aus Präzipitaten Erwähnung getan.

Versuch LXVIII. Verwendet wurden die Kochsalzextrakte aus einer Kultur Cholera und 3 Kulturen Vibrio XI, die im Versuch LXV beschrieben sind. Sie wurden teils allein, teils nach Zusatz von aktivem Meerschweinchenserum mit 0,25 cem Choleraextrakt versetzt.

0,25 ccm Extrakt aus sensib. Cholera	+ 0,25 ccm NaCl-Lösung:	klar
0,25 „ „ „ „ „	+ 0,25 „ Meerschweinchenserum:	Flockung mit Satzbildung
0,25 „ „ „ „ Vibrio XI	+ 0,25 „ NaCl-Lösung	
0,25 „ „ „ „ „ XI	+ 0,25 „ Meerschweinchenser.	} klar

Das Resultat ist nach 3h Beobachtung bei 42° verzeichnet; Meerschweinchenserum allein rief keine Präzipitation hervor.

Versuch LXIX. Es wurden hergestellt:

1) 1 Agarkultur Cholera	+ 10 ccm inaktives (56°) Rinderserum
2) 2 „ Vibrio Elvers	+ 10 „ „
3) 2 „ Typhus	+ 10 „ „

Nach 1h Aufenthalt bei 42° wurden die Bodensätze gewaschen und mit je 1 ccm NaCl-Lösung 1h bei 42° extrahiert. Im mikroskopischen Versuche lieferte Extrakt 1 in den Dosen 0,1, 0,005, 0,01 und 0,005 ccm ausschließlich oder fast ausschließlich Granula, der Extrakt 2 war absolut wirkungslos, der Extrakt 3 lieferte in den höchsten Dosen deutliche, aber gegenüber der Menge erhaltener Vibrionen verschwindende Granulabildung. Der Versuch wurde ausgeschaltet, weil das als Komplement benutzte Meerschweinchenserum für sich allein ziemlich starke Granulabildung erzeugte. Der Präzipitationsversuch wurde mit je 0,25 ccm Cholera und Typhusextrakt und dem gleichen Meerschweinchenserum als Komplement angestellt.

	2h 42°	Ueb. Nacht Zimmer- temperatur
0,25 ccm Chol.-Extr. + 0,25 ccm Extrakt 1 + 0,2 ccm Meerschw.-Ser.	Flockg.	Satz
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 2 + 0,2 „ „ „	0	Spur Satz
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 3 + 0,2 „ „ „	Flockg.	Satz
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 1 + 0,2 „ NaCl-Lösung	0	0
0,25 „ „ „ + 0,25 „ NaCl-Lös. + 0,2 „ Meerschw.-Ser.	0	Satz
0,25 „ Typh.-Extr. + 0,25 „ Extrakt 1 + 0,2 „ „ „	Flockg.	Satz
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 2 + 0,2 „ „ „	0	0
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 3 + 0,2 „ „ „	Flockg.	Satz
0,25 „ „ „ + 0,25 „ „ 3 + 0,2 „ NaCl-Lösung	0	0
0,25 „ „ „ + 0,25 „ NaCl-Lös. + 0,2 „ Meerschw.-Ser.	0	0

Versuch LXX. Je 2 Kulturen Cholera und Typhus wurden 1h bei 42° mit je 15 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, die Bodensätze gewaschen und 1h bei 42° mit je 2 ccm NaCl-Lösung digeriert.

	1h 42°	3h 42°
0,2 ccm Chol.-Extr. + 0,4 ccm Extrakt 1 + 0,2 ccm Meerschw.-Ser.	Flockg.	Satz
0,2 „ „ „ + 0,4 „ „ 2 + 0,2 „ „ „	Trüb?	Schwache Flockung
0,2 „ „ „ + 0,4 „ „ 1 + 0,2 „ NaCl-Lösung	0	0
0,2 „ „ „ + 0,4 „ „ 2 + 0,2 „ „ „	0	0
0,2 „ „ „ + 0,4 „ NaCl-Lös. + 0,2 „ Meerschw.-Ser.	0	0
0,2 „ Typh.-Extr. + 0,4 „ Extrakt 1 + 0,2 „ „ „	beginn. Flockg.	deutliche Flockung

							1h 42°	3h 42°
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	Flockg.	feine Flockung
0,2	„	„	+ 0,4	„	1	+ 0,2	NaCl-Lösung	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	„	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	NaCl-Lös.	+ 0,2	„ Meersch.-Ser.	0

Versuch LXXI. Je 10 ccm von 1) Cholera, 2) Typhusextrakt wurden mit je 20 ccm aktivem Rinderserum bei 42° gefällt, die Präzipitate wurden nach sorgfältiger Waschung 1h bei 42° mit je 2 ccm NaCl-Lösung extrahiert.

							2h 42°	15h Zimmer- temperatur
0,2 ccm Chol.-Extr.	+ 0,4 ccm Extrakt	1	+ 0,2 ccm Meersch.-Ser.	Flockg.	Satz			
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	Flockg.	Satz
0,2	„	„	+ 0,4	„	1	+ 0,2	NaCl-Lösung	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	„	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	NaCl-Lös.	+ 0,2	„ Meersch.-Ser.	0
0,2	„	Typh.-Extr.	+ 0,4	„	Extrakt	1	+ 0,2	„
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	„	Trübe; gering. Satz
0,2	„	„	+ 0,4	„	1	+ 0,2	NaCl-Lösung	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	2	+ 0,2	„	0
0,2	„	„	+ 0,4	„	NaCl-Lös.	+ 0,2	„ Meersch.-Ser.	0

Die Versuche bedürfen selbstverständlich nach jeder Richtung hin noch der Vervollständigung und Ausgestaltung. Sie sind hier nur gelegentlich erwähnt, um zu zeigen, daß nicht nur für die bakteriologische, sondern auch für die präzipitierende Form der Serumaktivität<sup>1)</sup> die relativ leichte Ablösbarkeit des einmal in Funktion getretenen Immunkörpers des Rinderserums gilt. Dabei tritt sehr auffällig hervor, daß man durch Behandlung von sensibilisierten Vibrionen und von Präzipitaten aus Bakterienextrakten mit Rinderserum keine an sich präzipitierenden Flüssigkeiten erhält, sondern daß Präzipitation erst nach Zusatz von Komplementen auftritt. Damit ist zum ersten Male ein Hinweis auf die lange vorausgesetzte Komplexität der fällenden Serumwirkung gegeben und alle Aeüßerungen der Serumaktivität als prinzipiell gleichartig erkannt. Für die Agglutination ist die Komplexität schon sehr frühzeitig aufgefunden worden; aber der Nachweis

1) Für die Agglutination gilt das gleiche wie für die Präzipitation. Extrakte aus sensibilisierten Vibrionen und aus Präzipitaten können gelegentlich an sich noch agglutinieren, in der Regel wirken sie erst nach Zusatz eines Komplementes.

derselben ist so schwierig, daß er bei gewöhnlicher Versuchsanordnung immer nur in einer Anzahl von Fällen gelungen ist. Für die Präzipitation bestehen die gleichen Schwierigkeiten; sind diese einmal überwunden, so ist damit für die unitarische Auffassung der Serumaktivität eine bedeutende Stütze gewonnen. Es ist dabei von großem Interesse, daß die Extrakte aus sensibilisierten Vibrionen und aus Cholera-präzipitaten keine Spezifität ihrer Wirkung erkennen lassen. Weitere Versuche müssen das noch genauer feststellen.

#### Zusammenfassung.

- 1) Durch Behandlung von mit Immunkörper sensibilisierten Vibrionen mit Kochsalzlösung bei 42° lassen sich Flüssigkeiten gewinnen, welche im Tierkörper wie im Reagenzglase bakteriolytisch wirksam sind.
- 2) Dasselbe Ergebnis gibt die Behandlung von Präzipitaten aus Choleraextrakten mit Kochsalzlösung.
- 3) Die Wirkung derartiger Extrakte ist nicht absolut, aber unverkennbar spezifisch.

## **Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. I No. 5.**

[Aus der Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf; Direktor:  
Prof. Dr. A. Schloßmann.]

### **Zur Frage des Ambozeptorgehaltes des Säuglingsblutes.**

Von Dr. J. Gewin (Amsterdam).

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Januar 1909.)

In dem menschlichen Blute sind bekanntlich verschiedenartige Normalambozeptoren vorhanden, die bisher noch wenig studiert wurden. Wir sind über ihre Herkunft und ihren Zweck noch in keiner Weise unterrichtet. Nun ist man in letzter Zeit infolge der Einführung der Wassermannschen Luesreaktion in die klinische Diagnostik auf gewisse gegen Hammelblut gerichtete Ambozeptoren des Menschenserums aufmerksam geworden. So hat Bauer<sup>1)</sup> gezeigt, daß im allgemeinen in der zur Luesdiagnostik verwendeten Menge des Menschenserums eine genügende Dosis von Ambozeptoren vorhanden ist, so daß man die Zufügung eines künstlichen Immunkörpers ersparen kann. Bauer hat weiterhin vorgeschlagen, in denjenigen Fällen, in denen der Hammelblutambozeptor des Menschenserums nicht zur Wirkung kommt oder nicht vorhanden ist, ihn durch den eines anderen menschlichen Serums zu ersetzen, besonders nachdem sich in letzter Zeit herausgestellt hat, daß bei Hinzufügen eines künstlichen Ambozeptors zu dem natürlichen zu leicht ein Ambozeptorüberschuß und dadurch ein falsches Resultat erzielt wird. Zu den Seris, bei denen ein Ergänzen des Ambozeptors notwendig ist, gehören vor allem die Sera junger Säuglinge. Er hat bei der Untersuchung von etwa 300 Neugeborenen gefunden, daß deren Serum des natürlichen Hammelblutambozeptors er-

---

1) Bauer, Zur Methodik des serologischen Luesnachweises. Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 16. Siehe auch Semaine médicale, 1908, 2. Sept.

mangelt<sup>1)</sup>, daß ferner im ersten Halbjahre der Gehalt des Serums an diesem Antikörper ein durchaus schwankender ist.

Betreffs des Auftretens von Haptinen beim Säugling im allgemeinen haben Halban und Landsteiner<sup>2)</sup> gelehrt, daß ein quantitativer Unterschied zwischen mütterlichem und fötalem Blute in bezug auf den Gehalt an Antistoffen besteht. Sie fanden, daß das Serum des Neugeborenen sowohl ärmer an Bakteriolytinen und Agglutininen, als auch an hämolytischen Ambozeptoren ist als das der Mutter. Da aber speziell über das Auftreten der gegen Hammelblut gerichteten Ambozeptoren beim Säugling noch keine Erfahrungen vorliegen, habe ich, zumal bei der Wichtigkeit dieses Antikörpers in der serologischen Luesdiagnostik, auf Anregung von Dr. Bauer eine Anzahl Säuglingssera auf ihren Gehalt an derartigen Antikörpern geprüft. Es hat mich besonders interessiert, festzustellen, ob etwa die Ernährung oder Krankheit des Säuglings auf die Bildung dieser Antistoffe einen Einfluß hat. Moro<sup>3)</sup> fand bei Infektionskrankheiten ein Ansteigen des Ambozeptorgehaltes im kindlichen Blute. Ferner sprach Pfäundler<sup>4)</sup> auf der diesjährigen Naturforscherversammlung davon, daß Nährstoffe unter besonderen Bedingungen den Säftebestand der Substanzen von Ambozeptorencharakter vermehren können.

Mein Material beläuft sich auf 75 Säuglinge, davon 25 Neugeborene. 15 der Säuglinge waren Brustkinder, 17 ausschließlich bei künstlicher Nahrung gewesen. Die übrigen 18 waren kürzere oder längere Zeit an der Brust gewesen und später mit Kuhmilch ernährt worden.

Was die Methodik betrifft, so mußte ich in Anbetracht dessen, daß man jungen Säuglingen nicht gar zu viel Blut entnehmen kann, mit Tropfen arbeiten. Es wurden in vier

1) Bauer, Das Collessche und Profetasche Gesetz im Lichte der modernen Serumforschung. Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 36.

2) Halban und Landsteiner, Ueber Unterschiede des fötalen und mütterlichen Blutserums etc. Münch. med. Wochenschr., 1902, p. 473.

3) Moro, Ueber das Verhalten der hämolytischen Serumstoffe. Wiesbaden, Bergmann, 1908.

4) Pfäundler, Biologische Probleme zur Frage der Säuglingsernährung. Nach einem Referat im Jahrb. f. Kinderheilk., 1908, S. 578.



kleine Reagenzröhrchen absteigende Mengen von Säuglingsserum gebracht (4, 3, 2 resp. 1 Tropfen), nachdem es  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $56^{\circ}\text{C}$  auf einem Wasserbade erhitzt worden war, um das im Menschenserum vorhandene Komplement zu zerstören, das zum Zwecke einer quantitativen Bestimmung des Ambozeptorgehaltes nicht brauchbar ist. Weiterhin kam in jedes Röhrchen ein Tropfen frischen Meerschweinchenserums (= Komplement) und 10 Tropfen einer 5-proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen. Bei jedem Versuch wurden zwei Kontrollen gemacht: eine mit 1 Tropfen Meerschweinchenserum und 10 Tropfen Blut und eine zweite mit 4 Tropfen inaktivierten Säuglingsserums und Blut. Alle Röhrchen wurden stets durch Tropfen von physiologischer Kochsalzlösung auf dasselbe Volumen gebracht. Der Versuch war nur gültig, wenn die Kontrollen völlig ungelöst blieben.

Nachdem die Gestelle 2 Stunden im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  gestanden hatten, wurden sie bis zum nächsten Morgen im Eisschrank bewahrt und dann der Grad der Hämolyse festgestellt.

In der Zusammenstellung meiner Resultate habe ich folgende Zeichen für den Lösungsgrad der einzelnen Sera benutzt:

- +++ = alle Röhrchen komplett gelöst,
- ++ = das letzte (vierte) Röhrchen mit 1 Tropfen Menschenserum ist mindestens noch mäßig gelöst,
- +
- = das erste Röhrchen zeigt sichere Lösung, mindestens „Spur“ (Ehrliche Bezeichnung).
- 0 = keine Spur von Lösung.

Obgleich unser Material kein sehr großes ist, so kommt man doch, wenn man Tabelle I auf p. 616 betrachtet, ohne weiteres zu dem Schlusse, daß sich Unterschiede im Verhalten der Brustkinder und der künstlich genährten Kinder in bezug auf den Ambozeptorgehalt finden. Wir wollen hier sogleich bemerken, daß sich unsere Schlußfolgerungen nur auf Befunde von normalen Hammelblutambozeptoren stützen, und sind uns wohl bewußt, daß sich bei anderen Normalambozeptoren etwas andere Verhältnisse ergeben.

So haben wir in einer Reihe von Fällen den Gehalt an Normalambozeptoren gegen Kaninchenblut geprüft. Oefers

Tabelle I.

Alter der Kinder:	Im Monat											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Nur natürlich ernährt	17) + 47) 0	20) 0 43) 0	14) 0 32) 0	13) +	15) 0 36) ++ 49) +	44) 0	12) +++ 16) ++ 18) 0	21) +				
Kurze Zeit natürlich, dann künstl. ernährt	40) 0	24) 0	10) 0 23) 0	19) ++ 28) ++		5) ++ 11) ++	9) ++ 35) ++ 41) ++	29) ++		25) ++ 26) ++	31) ++	2) ++ 27) ++ 30) ++
Nur künstlich ernährt	8) +	6) 0 7) 0 38) + 39) 0 48) 0	42) 0	46) ++ 50) ++	4) ++	1) ++	3) ++ 34) ++ 45) ++		37) ++			22) ++ 33) ++

Tabelle II.

Alter der Kinder:	I	II	III	IV	V	VI	Im Monat	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Gesunde Kinder	47) 0	20) 0 39) 0 43) 0 48) 0	23) 0 32) 0	13) + Ecs. Diathese 19) + Ekzema	4) ++ Ernähr.- störung Bronch.	1) +++ Cystitis Pneum. 5) ++ Ernähr.- störung Lues	3) +++ Cystitis Ekzema 6) ++ Ernähr.- störung Tuberk.	29) ++ Ernähr.- störung 34) ++ Ernähr.- störung Pneum.	16) ++ 18) 0	21) +	25) ++ Ernähr.- störung 26) ++ Furunkulosis 37) ++ Ernähr.- störung	31) ++ Pneum.	2) +++ Ernähr.- störung 22) ++ Tuberk. 27) ++ Tuberk. 30) ++ Ernähr.- störung 33) ++ Ernähr.- störung
Kranke Kinder	8) + Ophth. Blen. 17) + Polyadenie 40) 0 Ophth. Blen.	6) 0 Pemphigus 7) 0 Pemphigus 24) 0 Lues 38) + Ernähr.- störung	10) 0 Ernähr.- störung Nephritis Ecs. 14) 0 Diathese 42) 0 Furunkulosis	13) + Ecs. Diathese 19) + Ekzema 28) ++ Ernähr.- störung 46) + Pneum. 50) ++ Lues	4) ++ Ernähr.- störung Bronch. 49) + Lues	1) +++ Cystitis Pneum. 5) ++ Ernähr.- störung Lues	3) +++ Cystitis Ekzema 6) ++ Ernähr.- störung Tuberk.	29) ++ Ernähr.- störung 34) ++ Ernähr.- störung Pneum.	16) ++ 18) 0	21) +	25) ++ Ernähr.- störung 26) ++ Furunkulosis 37) ++ Ernähr.- störung	31) ++ Pneum.	2) +++ Ernähr.- störung 22) ++ Tuberk. 27) ++ Tuberk. 30) ++ Ernähr.- störung 33) ++ Ernähr.- störung

fanden wir zwar eine Uebereinstimmung im Gehalt an Zwischenkörpern für Hammel- und Kaninchenblut; einige Male jedoch auch ganz entgegengesetzte Resultate.

Vier Fälle sind in dieser Beziehung sehr bezeichnend, so daß wir nicht umhin können, sie hier anzuführen.

No. 16. Ballmann (Heinrich).

Alter: 7 Monate 13 Tage.

Ernährung: nur Muttermilch.

Diagnose: gesund (Ammenkind).

Hämolyse: I. Hammelblut ++  
II. Kaninchenblut 0.

No. 19. Kallenbroich (Emil).

Alter: 3 Monate 21 Tage.

Ernährung: 10 Tage Muttermilch, dann verdünnte Kuhmilch,  
seit 18 Tagen Ammenmilch.

Diagnose: Ekzema capitis.

Hämolyse I. Hammelblut +  
II. Kaninchenblut 0.

No. 26. Noll (Elisabeth).

Alter: 9 Monate 6 Tage.

Ernährung: kurze Zeit Muttermilch dann unnatürlich ernährt.

Diagnose: Ernährungsstörung, Furunkulosis.

Hämolyse: I. Hammelblut +++  
II. Kaninchenblut 0.

No. 74. Salomon (gesundes Neugeborenes).

Alter: 0 Tage.

Hämolyse: I. Hammelblut 0  
II. Kaninchenblut ++.

Wie schon erwähnt, haben die von mir untersuchten Neugeborenen *sera* niemals den geringsten Gehalt an Hammelblutzwischenkörpern gezeigt, weswegen wir sie in der Tabelle ausgelassen haben. Im ersten Monate sehen wir jedoch einige Fälle von einem allerdings minimalen Auftreten dieses Körpers. Im allgemeinen ist aber der Gehalt im ersten Halbjahre doch ein äußerst geringer.

Dabei zeigt sich denn, daß gerade bei den unnatürlich genährten Kindern der Ambozeptorgehalt früher auftritt als bei den Brustkindern und vor allem in stärkerem Maße.

Dazwischen stehen etwa diejenigen Säuglinge, die anfänglich Muttermilch erhielten und früher oder später abgestillt wurden.

Sehr auffallend waren die Fälle von gesunden Ammenkindern, die ausschließlich an der Brust gewesen waren, und bei denen selbst im 6.—8. Monate sich keine Spur von Zwischenkörpern fand, oder etwa das Kind, welches im 9. Monate nur eine verschwindende Menge derselben aufwies. Keines der mit Kuhmilch ernährten Kinder hat hingegen von dem 3. Monate ab der Ambozeptoren ermangelt, auch diejenigen nicht, die in der ersten Zeit an der Brust gewesen waren. — Andererseits gibt es doch einige, wenn auch spärliche Fälle, in denen Brustkinder schon frühzeitig den genannten Zwischenkörper aufwiesen, allerdings in minimalen Mengen.

Wir haben auf Grund des klinischen Befundes den Eindruck gehabt, daß in diesen Fällen Infektionen eine Rolle gespielt haben, indem sie ein früheres Auftreten des Zwischenkörpers verursachten. Im folgenden haben wir versucht, den Einfluß von Krankheiten auf die Bildung des normalen Ambozeptors tabellarisch festzulegen. Siehe Tabelle II, p. 616.

In der Rubrik „Gesunde Kinder“ haben wir erstens die von uns untersuchten Ammenkinder, soweit sie keinerlei Krankheitserscheinungen zeigten, untergebracht, ferner aber auch Säugling, die wegen Nabelbruch, Hasenscharte etc. in Behandlung kamen ohne Zeichen irgend welcher Infektion oder Ernährungsstörung.

Beim ersten Blick auf die Tabelle fällt auf, daß sie eine große Aehnlichkeit mit der Tabelle I besitzt. Tatsächlich zeigt namentlich die Rubrik „Gesunde Kinder“ der Tabelle II eine auffällige Uebereinstimmung mit der Rubrik „Brustkinder“ aus Tabelle I. Es zeigt sich nur, daß einige Brustkinder, die frühzeitig den Ambozeptornachweis gestatteten, in Tabelle II in die untere Rubrik „Kranke Kinder“ herübergekommen sind und umgekehrt einige junge künstlich genährte Säuglinge (ohne Ambozeptorgehalt!) der Tabelle II in die obere Rubrik „Gesunde Kinder“ aufgerückt sind.

Nach alledem kann man sich dem Schlusse nicht entziehen, daß der Ernährung und Infektion auf die Bildung normaler Ambozeptoren beim Säuglinge entschieden ein Einfluß zukommt.

Es läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden, welcher der beiden Faktoren von größerer Wichtigkeit und ursprünglicher Bedeutung ist, zumal wir ja wissen, daß künstlich ernährte Säuglinge leicht Infektionen akquirieren. Es ist wohl möglich, daß die Krankheit als solche die primäre Ursache der frühzeitigen Ambozeptorenbildung beim Säuglinge ist.

Jedenfalls sehen wir, daß die Aufgaben, die dem Organismus des unnatürlich ernährten Säuglings gestellt werden, auch auf diesem Gebiete andere sind, als die des Brustkindes, insofern jener gezwungen ist, frühzeitig gewisse Zwischenkörper zu bilden, also zu einer Zeit schon außergewöhnliche Leistungen zu vollbringen, in der das Kind an der Brust, frei vom Kampf mit der Außenwelt, nur seinem eignen Körper lebt.

#### Zusammenfassung.

Der Hammelblut lösende Ambozeptor des Menschen-serums findet sich beim Neugeborenen noch nicht.

Er bildet sich im allgemeinen im Laufe des ersten Lebensjahres und tritt erst im zweiten Halbjahr in voller Stärke auf.

Gesunde Säuglinge, besonders auch Brustkinder, bilden diesen Antikörper erst in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres, während die unnatürlich ernährten und kranken Säuglinge ihn schon in den ersten Lebensmonaten besitzen.

Ernährung und Krankheit haben also auf die Bildung dieses Ambozeptors Einfluß.

Das Auftreten dieses Ambozeptors läßt keinen Rückschluß zu auf das anderer Normalambozeptoren.

3. Januar 1909.

[Aus den Runcorn Research Laboratories der Liverpool School of Tropical Medicine.]

### **Zum Mechanismus der Atoxylwirkung.**

Von **A. Breinl** und **M. Nierenstein**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Januar 1909.)

Im Sommer 1907 wurden im hiesigen Laboratorium Versuche angestellt zwecks Hervorrufung einer passiven Immunität gegenüber Naganatrypanosomen. Es wurden sowohl Kaninchen, Ratten und Mäuse als auch mehrere Esel mit einer Mischung von Atoxyl und Nagana resp. Dourinetrypanosomen injiziert, welche Mischung während verschiedener Zeiträume (bis zu einer Stunde) und bei verschiedener Temperatur (Zimmertemperatur und 37° C) in Kontakt gehalten wurde. Diese Experimente führten zu den Resultaten, daß die Kaninchen, Ratten und Esel nach einer mehr oder weniger verlängerten Inkubationsperiode Trypanosomen in ihrem peripheren Blute zeigten und nach einem normalen Verlaufe der Infektion der Krankheit erlagen. Nur Mäuse verhielten sich in dieser Beziehung verschieden, indem von 6 Mäusen, die mit einer Mischung einer 1-proz. Lösung von Atoxyl und Dourinetrypanosomen enthaltenden Blutes zu gleichen Teilen injiziert worden waren, nur eine einzige, und diese nur während ganz kurzer Zeit (2 Tage), Parasiten in geringer Anzahl im Blute zeigte, während in den übrigen sogar nach monatelanger Beobachtung Parasiten im Blute nie nachgewiesen werden konnten, eine Tatsache, die wohl nur dadurch erklärt werden kann, daß die Trypanosomeninfektion in Mäusen in vieler Beziehung einen etwas modifizierten und leichteren Verlauf nimmt, als in Kaninchen, Ratten und Eseln.

Diese Beobachtungen, daß Atoxyl auf Trypanosomen in vitro keinen Einfluß ausübte, war um so auffallender, als anorganisches Arsen sogar in stärkster Verdünnung auf Trypanosomen in vitro abtötend einwirkt und auch in den Händen Thomas' und Breinls (1904) Atoxyl eine deutliche trypanozide Wirkung im Deckglaspräparate entfaltet hatte.

Spätere Beobachter, wie Ehrlich (1) und Uhlenhuth (2), hingegen konnten diese Eigenschaft nicht feststellen. Die Verschiedenheit der Resultate findet ihre Erklärung wohl nur darin, daß die früheren Atoxylpräparate, wie Nierenstein (3) nachweisen konnte, freie Arsensäure enthielten, während die neueren Präparate keine derartige Verunreinigung aufweisen.

Während nun in den ersten Beobachtungen die Wirkung des Atoxyls, des Natriumsalzes der Arsanilsäure nur auf der Anwesenheit des Arsensäure-Radikals beruhen sollte, wurde in späterer Zeit, so besonders von Mesnil und Nicolle (4), auch Wert gelegt auf die Anwesenheit von Stickstoff sowohl in den trypanoziden Farbstoffen als auch im Atoxyl, und Moore, Nierenstein und Todd (5) gingen so weit, die Amidogruppen in den Farbstoffen als „trypanophobe“ Gruppen zu bezeichnen.

Weitere Untersuchungen Nierensteins (6) haben ferner den Beweis erbracht, daß sich durch die Amidogruppe das Atoxyl mit den Serumproteiden verbindet, und daß ihrer vermittelnden Rolle somit ein großer Wert in der Atoxylbehandlung beizulegen ist, wozu letzterer Ansicht später Woithe (7) beipflichtete.

Die Feststellung der Tatsache, daß sich das Atoxyl durch die Amidogruppe mit den Serumproteiden verbindet, gab die Veranlassung zu Versuchen, ob sich die Atoxylserumkombination vielleicht prophylaktisch gegen Trypanosomeninfektion verwenden ließe. Es wurde zu diesem Zwecke eine 5-proz. Atoxyllösung mit der gleichen Menge Eselserum vermischt, durch 24 Stunden im Schüttelapparate belassen und hierauf Ratten subkutan injiziert. Dabei erwies sich die Atoxylserumkombination viel toxischer als eine äquivalente Menge von Atoxyl in physiologischer Kochsalzlösung, indem 1 ccm der Mischung, entsprechend 0,025 g Atoxyl, das von ausgewachsenen Ratten ohne Schaden vertragen wird, 6 Ratten in wenigen Tagen unter den typischen Erscheinungen der Atoxylvergiftung tötete.

Es schien daher, als ob normales Serum das Atoxyl mit Rücksicht auf seine Toxizität chemisch veränderte. Mit Rücksicht darauf wurden weitere Versuche unternommen, ob vielleicht auch Organemulsionen eine ähnliche Einwirkung auf

das Atoxyl ausübten. Da nun die Leber im Falle einer Atoxylvergiftung gewöhnlich die schwersten Veränderungen aufweist, in Form einer fettigen Degeneration, so wurde eine 5-proz. Atoxylösung in physiologischer Kochsalzlösung mit dem gleichen Gewichte von fein zerhackter Kaninchenleber während 24 Stunden im Schüttelapparate gemischt, die Mischung zentrifugiert und die trübe überstehende Flüssigkeit mit Rücksicht auf ihre Toxizität in vivo und in vitro untersucht. Dabei konnte einerseits keine Einwirkung auf Trypanosomen im Deckglaspräparate und anderseits auch kein Unterschied gegenüber einer äquivalenten Menge von Atoxyl bei Injektion in Ratten festgestellt werden. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde ferner auch mit Naganatrypanosomen enthaltendem Blute vermischt, und nach verschiedenzeitigem Kontakt 6 Ratten intraperitoneal injiziert; alle Tiere zeigten nach einer etwas verlängerten Inkubationsperiode Trypanosomen in ihrem Blute und erlagen der Infektion.

Ähnliche Versuche, jedoch mit modifizierter Technik, wurden vor einiger Zeit von Levaditi und Yamanouchi (8) ausgeführt. Sie wurden hierzu durch Ehrlichs (9) Beobachtungen angeregt, daß Benzolarsenderivate den Arsanilsäuren gegenüber einen viel eklatanteren Einfluß auf Trypanosomen in vivo und in vitro ausübten, was nach Ehrlichs Ansicht auf der niederen Reduktionsstufe der ersteren gegenüber den Arsanilsäuren eventuell beruhen könnte.

Levaditi und Yamanouchi vermischten für diese Versuche eine 4-, 2- resp. 0,2-proz. Atoxylösung mit der gleichen Menge einer Leberemulsion in physiologischer Kochsalzlösung und fanden, daß diese Mischung nach einem zweistündigen Aufenthalte bei 38° C sich außerordentlich toxisch für Trypanosomen erwies, indem dieselbe die Parasiten sofort bewegungslos machte und nach einiger Zeit vollkommen zerstörte.

Die Autoren erklärten diese Resultate durch die Annahme, daß die Leber durch ihr Reduktionsvermögen das Atoxyl in eine trypanolytische Substanz umwandelte, die sie als „Trypanotoxyl“ bezeichneten. Eine ähnliche Eigenschaft besitzt nach ihren Versuchen ebenfalls Lunge und Muskel, während



sich Leukocyten, Niere, Knochenmark, Milz und Rückenmark in dieser Hinsicht negativ verhielten.

Nach dem Erscheinen der Levaditi-Yamanouchischen Arbeit nahmen wir unsere Versuche wieder auf, wobei wir uns vollkommen an die beschriebene Technik anschlossen.

Wir vermischten 10 ccm einer 4-, 2- resp. 0,2-proz. Atoxyl-lösung mit der gleichen Menge einer Emulsion von Kaninchenleber in physiologischer Kochsalzlösung und setzten diese Mischung für 2 Stunden einer Temperatur von 37° C aus. Hierauf wurden die Mischungen mit Rücksicht auf ihren trypanoziden Einfluß im Deckglaspräparate untersucht.

In dem ersten diesbezüglichen Experimente konnten wir feststellen, daß die Mischung beinahe gar keinen Effekt auf die Trypanosomen ausübte; in einem späteren analogen Experimente hingegen konnten wir die Levaditi-Yamanouchischen Beobachtungen vollkommen bestätigen<sup>1)</sup>.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß wir vielleicht das „Trypanotoxyl“ von der Leber-Atoxylmischung trennen könnten, dialysierten wir das Reaktionsgemisch gegenüber Leitungswasser. Ein Teil des Dialysates wurde auf dem Wasserbade eingengt und in isotonischer Lösung zu trypanosomenhaltigem Blute hinzugefügt, wobei wir beobachten konnten, daß das Dialysat Trypanosomen mit der gleichen Rapidität abtötete und auflöste, wie das ursprüngliche Leber-Atoxylgemisch.

Ein weiterer Teil des Dialysates wurde nach Ansäuern mit Schwefelwasserstoff behandelt; es konnte deutlich anorganisches Arsen ausgefällt, werden. Das Atoxyl, welches für diese Versuche verwendet wurde, war vollkommen frei von jeglicher Beimischung von anorganischem Arsen.

Wir wiederholten diese Versuche einige Male — wobei wir jedesmal neue Kaninchenleber verwendeten — mit verschiedenen Resultaten, siehe Tabelle I, p. 624.

Die folgende Tabelle zeigt deutlich, daß nur in jenen Fällen, in denen anorganisches Arsen in der filtrierten resp. dialysierten Leber-Atoxylmischung nachgewiesen werden konnte, dieselbe

---

1) Dieser Unterschied der Resultate beruht wohl auf der Verschiedenheit der Kaninchenleber mit Rücksicht auf Fütterung, Jahreszeit etc.

1) Siehe Fußnote p. 627.

Leber- emulsion	Verdünnung des Atoxyls	Trypanosomen- stamm	Wirkung	Arsenbefund
Experiment I 10 ccm 10 „ 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 ccm einer 4-proz. Lösung 2 „ 0,2 „ „ 4 „ 2 „ 0,2 „	Tryp. Brucei „ „ „ „ „ „	Tryp. noch beweglich nach 1½ Stunden desgl. Tryp. sofort bewegungslos desgl. Tryp. bewegungslos nach 10 Minuten	negativ „ „ stark positiv „ positiv
Experiment II 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 4 „ „ 4 „	dimorphon „ „ „ Evansi	Tryp. noch beweglich nach 1 Stunde desgl. Tryp. bewegungslos nach 2—3 Minuten	negativ „ deutlich positiv
Experiment III 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 2 „ 0,2 „ 4 „	„ „ „ Evansi	Tryp. bewegungslos nach 10—15 Minuten	positiv „
Experiment IV 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 2 „ 0,2 „ 4 „	„ „ Brucei	Tryp. bewegungslos nach 10—15 Minuten	positiv negativ¹)
Experiment V 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 4 „ 0,2 „ 4 „	„ „ Evansi	Tryp. noch lebhaft beweg- lich nach 1½ Stunden	„ „
Experiment VI 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 4 „ 0,2 „ 0,2 „	„ „ „ „	Tryp. bewegungslos nach 10—15 Minuten Tryp. unbeweglich nach 45 Minuten	positiv¹) „ „
Experiment VII 10 „ 10 „ 10 „ 10 „	10 „ 4 „ 2 „ 0,2 „	„ „ „ „	Tryp. noch beweglich nach 1½ Stunden	negativ „ „

auch einen deutlichen trypanoziden Einfluß im Deckglaspräparate ausübte, während bei Abwesenheit dieses die Mischung Trypanosomen gar nicht beeinflusste.

Als Fortsetzung dieser Versuche ließen wir Leberemulsion in physiologischer Kochsalzlösung auf die gleiche Menge einer, wie oben ausgeführt, präparierten Atoxyl-Serumkombination, die wir in Zukunft der Kürze halber als „Atoxylserum“ bezeichnen wollen, einwirken. Es wurde einerseits Serum eines mit Trypanosoma Brucei infizierten Esels, und andererseits normales Eselserum verwendet.

Das Serum wurde mit der gleichen Menge einer 5-proz. Atoxyllösung vermischt, während 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Schüttelapparate belassen, und hierauf der Ueberschuß von freiem Atoxyl gegen einen kontinuierlichen Strom von Leitungswasser dialysiert. Nach 3—4 Tagen ließ sich in der Regel kein freies Atoxyl mehr im Dialysate nachweisen.

Die Probe wurde in der Weise ausgeführt, daß 50 ccm des Dialysates zur Trockenheit im Kjeldahl-Kolben eingedampft, hierauf mit 30 ccm arsenfreier konzentrierter Schwefelsäure versetzt wurden, um das Atoxyl zu zerstören. Der Rückstand wurde dann nach der von Nierenstein (6) modifizierten Gutzeit-Sangerschen Methode auf Arsen geprüft.

100 ccm des so erhaltenen Atoxylserums wurden mit 100 ccm von Kaninchenleberemulsion vermischt und während zweier Stunden einer Temperatur von 37° C ausgesetzt. Das Gemisch wurde hierauf dialysiert; das Dialysat zeigte nach 2 Stunden mit Schwefelwasserstoff deutlich freies Arsen, während das zu gleicher Zeit angesetzte Atoxylserum ohne Zusatz von Leberemulsion keine Spur einer solchen Reaktion zeigte.

Zu gleicher Zeit wurden Versuche angestellt, in denen anstatt Leberemulsion, aus später anzuführenden Gründen, Wasserstoffsuperoxyd dem Atoxylserum beigelegt wurde. Auch hierbei konnte im Dialysate nach einem 2-stündigen Aufenthalte bei 37° C mittels Schwefelwasserstoffes freies Arsen nachgewiesen werden. Tabelle II zeigt die Resultate dieser Versuche.

Tabelle II.

Atoxylserum			Leber- emulsion	Wasserstoff- superoxyd	Arsenbefund im Dialysate mittels $H_2S$
Infiziertes Serum	100 ccm		100 ccm	ø	deutlich positiv
" "	20 "		ø	ø	negativ
" "	50 "		ø	10 ccm	positiv
Normales Serum	100 "		100 ccm	ø	deutlich positiv
" "	20 "		ø	ø	negativ
" "	50 "		ø	10 ccm	positiv

Zur Lösung der Frage nach der Quantität des Arsens, welche durch Leberemulsion aus dem Atoxylserum in Freiheit gesetzt wird, wurden 200 ccm normalen Eselserums mit 200 ccm einer 5-proz. AtoxylLösung durch 48 Stunden im Schüttelapparate belassen und hierauf durch 3 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert, bis sich im Dialysate mittels der oben beschriebenen Methode kein freies Atoxyl mehr nachweisen ließ. 200 ccm des so präparierten Atoxylserums wurden mit 200 ccm der Kaninchenleberemulsion versetzt und während 24 Stunden einer Temperatur von  $37^{\circ} C$  ausgesetzt. Nach Dialysierung der Mischung gegen 800 ccm destillierten Wassers wurde das Dialysat auf 50 ccm eingengt, angesäuert und das Arsen mittels Schwefelwasserstoffes ausgefällt, der Niederschlag im Goach filtriert und mit Salpetersäure oxydiert. Zur Neutralisation wurde Natriumkarbonat verwendet. Nach Reduktion der Lösung mittels schwefeliger Säure wurde mit  $\frac{1}{100}$ -normal Jodlösung titriert, wozu 8,7 ccm Jodlösung verbraucht wurden, was 0,0042 g  $As_2O_3$  entspricht.

Da das Freiwerden des Arsens aus dem Atoxyl eventuell auf einem Oxydationsvorgang beruhen konnte, wurden Versuche in der Richtung unternommen, ob vielleicht auch Wasserstoffsuperoxyd imstande wäre, eine der Leberemulsion analoge Einwirkung auf das Atoxyl zu entfalten. Geleitet wurden wir zu dieser Schlußfolgerung durch die Dakinschen (10) Arbeiten, welche bewiesen, daß Fettsäuren durch Wasserstoffsuperoxyd in derselben Weise oxydiert werden, wie im lebenden Organismus. Und wir konnten tatsächlich feststellen, daß Wasserstoffsuperoxyd imstande ist, aus dem Atoxyl Arsen abzuspalten. Tabelle III zeigt in Kürze die erhaltenen Resultate.

Tabelle III.

Atoxyllösung	Wasserstoffsupperoxyd	Arsenbefund durch $H_2S$
20 ccm einer 4-proz. Lösung	3 ccm	stark positiv
10 „ „ 2 „ „	3 „	„ „

Wiederholung dieses Versuches gab dieselben Resultate.

Nachdem wir somit bewiesen hatten, daß es leicht gelingt, mittels Oxydationsreagentien, wie Wasserstoffsuperoxyd, aus dem Atoxyl Arsen abzuspalten, untersuchten wir den Einfluß von Oxydationsfermenten der Oxydasen sowohl der Leber, als auch pflanzlicher Oxydasen auf Atoxyl.

Es wurden nach der Bachschen (11) Methode Oxydase aus Leber und aus schwarzem Tee präpariert und mit Hilfe derselben den früheren analoge Versuche unternommen. Dabei zeigte sich, daß sowohl tierische als auch pflanzliche Oxydase imstande ist, jedoch in viel geringerem Grade als Wasserstoffsuperoxyd aus dem Atoxyl Arsen abzuspalten. Siehe Tabelle IV.

Tabelle IV.

Oxydase	Atoxyllösung 1%	Arsenbefund mittels $H_2S$
aus Tee 10 ccm	10 ccm	negativ
„ „ 20 „	10 „	„
„ „ 30 „	10 „	„
„ „ 40 „	10 „	„
„ „ 60 „	10 „	positiv
aus Leber <sup>1)</sup> 10 ccm	10 ccm	negativ
„ „ 20 „	10 „	„
„ „ 30 „	10 „	„
„ „ 40 „	10 „	„
„ „ 50 „	10 „	positiv
„ „ 60 „	10 „	„

1) In den Kaninchenlebern, welche zu Experiment V und VI, Tabelle I, verwendet wurden, wurde eine quantitative Bestimmung der Leberoxydase vorgenommen. Hierzu wurde die Leber mit 100 ccm 40-proz. Alkohols durch 24 Stunden extrahiert, filtriert und die Oxydase mit 40 ccm absoluten Alkohols gefällt. Dieselbe wurde hierauf in 250 ccm Wassers gelöst. 100 ccm der Oxydaselösung wurden mit 100 ccm 1-proz. Pyrogallollösung durch 24 Stunden bei 37° C digeriert, das gebildete Purpurogallin im Goach abfiltriert, mit Alkohol und Aether gewaschen und hierauf bei 40° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Leber von Kaninchen V gab 0,0914 g Purpurogallin, die von Kaninchen VI 1,1594 g Purpurogallin.

Auf eine nähere Erklärung dieser Versuche werden wir später zurückkommen.

Nachdem wir die Einwirkung von oxydativen Fermenten auf Atoxyl untersucht hatten und dabei nachweisen konnten, daß durch dieselben Arsen aus dem Atoxyl abgespalten wird, war das weitere Bestreben darauf gerichtet, zu ermitteln, ob vielleicht auch die reduktiven Fermente, wie z. B. die Reduktasen, das Atoxyl in analoger Weise spalten.

Zur Herstellung der Reduktase wurde käufliche Hefe verwendet; diese wurde mit Kochsalzlösung für 4 Stunden bei Zimmertemperatur digeriert und hierauf filtriert. Das Filtrat zeigte deutlich eine positive Philothionreaktion für Reduktase. [Vergl. Czapek (12).]

Die so präparierte reduktasehaltige Flüssigkeit wurde mit 10 ccm einer Atoxylösung von verschiedener Konzentration versetzt und nach 2-stündigem Aufenthalt bei 37° C mit Rücksicht auf ihre Wirksamkeit auf trypanosomenhaltiges Blut und auch auf ihren Gehalt an freiem Arsen geprüft.

Mit dem Reste wurde die Hoffmannsche Anilinreaktion vorgenommen. Siehe Tabelle V.

Tabelle V.

Atoxylösung	Hefeextrakt	Wirkung auf Tryp. Evansi	Arsenbefund	Anilinfund
10 ccm einer 4-proz. Lösung	3 ccm	Tryp. noch beweglich nach 2 Std.	Spuren	negativ
10 ccm einer 2-proz. Lösung	3 „	Tryp. unbeweglich nach 45 Min.	positiv	schwach positiv
10 ccm einer 0,2-proz. Lösung	2 „	Tryp. unbeweglich nach 1 Std.	„	schwach positiv

Auffällig war in diesem Versuche die Tatsache, daß das Hefeextrakt aus der 4-proz. Atoxylösung viel weniger Arsen in Freiheit setzte als aus den weniger konzentrierten Lösungen. Als Erklärung dafür könnte vielleicht die Annahme dienen, daß das, in der höher konzentrierten Lösung anfänglich lebhafter abgespaltene Arsen die Reduktase abtötete und so eine weitere Einwirkung inhibierte. Auffällig war fernerhin die Anwesenheit von freiem Anilin in der Mischung.

Zur Bekräftigung dieser Beobachtung wurde folgende Versuchsanordnung unternommen: 300 g käuflicher Hefe wurden mit 400 ccm Kochsalzlösung über Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert. 150 ccm des Filtrates wurden mit 150 ccm 2½-proz. Atoxylösung vermischt und durch 24 Stunden bei 37 ° C stehen gelassen. Die Lösung wurde hierauf alkalisch gemacht und im Wasserdampfe destilliert. Das Destillat gab deutlich die Hoffmannsche Reaktion auf Anilin. Im abgekühlten Rückstande konnte nach Ansäuern mittels Schwefelwasserstoffes Arsen gefällt werden<sup>1)</sup>.

#### Theoretische Betrachtung.

Versucht man nun, die oben angeführten Experimente von einem einheitlichen Gesichtspunkte aus zu betrachten und sich über den Mechanismus der pharmakologischen Wirkung des Atoxyls auf die Trypanosomen klar zu werden, so kann man wohl die ursprüngliche Auffassung, daß das Atoxyl als solches direkt als inneres Desinfiziens wirkt, leicht von der Hand weisen; denn in diesem Falle müßte dasselbe wohl auch in vitro einen deutlich parasitiziden Einfluß ausüben, was ja, wie schon früher erwähnt, durch zahlreiche Beobachtungen widerlegt worden ist.

Es muß also jedenfalls das Atoxyl im Organismus durch Veränderungen untergehen, wobei es unter dem Einflusse der Zelltätigkeit die Eigenschaft erhält, die Parasiten im Blute abzutöten. Ehrlich, des ferneren Levaditi und Yamanoichi haben nun als solches eine hypothetische Reduktionsstufe angenommen, welcher von den letzteren Autoren der Name „Trypanotoxyl“ beigelegt wurde.

Nach unseren Versuchen scheint die Annahme eines komplizierten Reduktionsproduktes des Atoxyls überflüssig zu sein. Dieselben zeigen vielmehr, daß nur in jenen Fällen, in denen durch die Leberemulsion Arsen von dem Atoxyl abgespalten wurde, das Reaktionsgemisch eine deutliche trypano-

---

1) Friedbergers (13) Beobachtungen, daß Atoxyl nach Zusatz von Thioglykolsäure trypanozide Eigenschaft in vitro erhält, beruht wahrscheinlich auf einem ähnlichen Reduktionsvorgang.

zide Eigenschaft besaß, während im Falle der Abwesenheit des Arsens in der Lösung kein abtötender Einfluß auf die Parasiten festgestellt werden konnte.

Diese Beobachtungen weisen also darauf hin, daß zwischen der Arsenabspaltung durch die Leberemulsion und der Einwirkung des Atoxyls auf Trypanosomen *in vitro*, und aller Wahrscheinlichkeit nach in ausgedehnterem Maße auch *in vivo* ein Einklang bestehen muß. Es ist nun sehr nahelegend, anzunehmen, daß in der Leber hauptsächlich das organische Ferment, die Oxydase, die ja auch sonst im Organismus ziemlich verbreitet ist, diese Spaltung des Atoxyls herbeiführt, eine Annahme, welche durch unsere Resultate gestützt wird. Demnach wäre also die Atoxylwirkung im Organismus als ein einfacher Oxydationsprozeß aufzufassen, durch den aus dem Atoxyl das Arsen unter Verbrennung des Benzolkernes in Freiheit gesetzt wird. So ist es uns auch gelungen, das Atoxyl durch die oxydierende Wirkung von Schimmelpilzen in analoger Weise zu spalten.

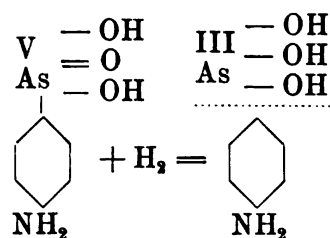
Wir stellen uns also den Mechanismus der Atoxylwirkung in der Weise vor, daß sich dasselbe durch die freie Amidogruppe mit den Serumproteiden verbindet und daß dieses Atoxylserum indirekt auf die Trypanosomen einen Einfluß ausübt, indem vermittels der oxydativen Fermente des Organismus und auch durch die Trypanosomen selbst Arsen in Freiheit gesetzt wird, das *in statu nascendi* die Abtötung der Parasiten herbeiführt. Wäre die Amidogruppe also der chromophoren Gruppe eines Farbstoffes zu vergleichen, so kommt den Serumproteiden die Rolle einer Beize zu. Diese Auffassung erhält eine Stütze durch die von anderen und uns selbst gemachte Beobachtung der Atoxylfestigkeit und könnte als Erklärung für die Tatsache angeführt werden, daß Trypanosomen die Eigenschaft der Atoxylfestigkeit in ausgesprochenem Maße nur für eine gegebene Tierspecies zeigen, da die Parasiten nur gegen die eine Atoxylproteinkombination eine Immunität erworben haben.

Der Befund von freiem Arsen im Urin nach Atoxylreichung ist eine fernere Stütze für die Annahme, daß das Atoxyl im Organismus eine Oxydation erleidet.



Neben diesem Oxydationsvorgange, welcher zur Bildung eines fünfwertigen Arsens führt, geht gleichzeitig auch ein Reduktionsprozeß, in aller Wahrscheinlichkeit fermentativer Natur, im Organismus vor sich, wie wir es in analoger Weise mittels Hefe in vitro nachweisen konnten, welcher zur Bildung eines dreiwertigen Arsens in statu nascendi führt. Es spalten die Reduktasen das Atoxyl in Arsen resp. arsenige Säure und Anilin.

Der Prozeß verläuft wahrscheinlich folgendermaßen:



Und es ist dem einen von uns auch gelungen, freies Anilin nur in Faeces (6) eines Pferdes, das längere Zeit unter Atoxylbehandlung stand, und weiterhin auch in den Faeces eines Affen nachzuweisen, ein Beweis dafür, daß dieser Prozeß in der Tat im Organismus vor sich geht.

### Zusammenfassung.

I. Das Atoxyl verbindet sich zum Teil durch die Amidogruppe mit den Serumproteiden.

II. Durch einen Oxydationsprozeß, sowohl durch die oxydativen Fermente als auch wahrscheinlich durch die Trypanosomen selbst wird das Atoxylserum oxydiert und Arsen in Freiheit gesetzt unter Verbrennung des aromatischen Kernes.

III. Zur selben Zeit geht auch ein Reduktionsprozeß vor sich, durch den das Atoxyl in arsenige Säure und Anilin gespalten und das Anilin durch die Faeces ausgeschieden wird.

IV. Das, zum Teil durch oxydative, zum Teil durch reduktive Fermente und wahrscheinlich auch durch die Try-

panosomen in Freiheit gesetzte Arsen in statu nascendi übt den zerstörenden Einfluß auf die Parasiten aus.

#### Literatur.

- 1) Ehrlich, Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 9—12.
- 2) Uhlenhuth, Hübener und Woithe, Experimentelle Untersuchungen über Dourine mit besonderer Berücksichtigung der Atoxylbehandlung. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 26, Heft 2, 1907.
- 3) Nierenstein, Chemical Notes on Atoxyl. Annals of Trop. Med. and Parasit., Vol. 2, 1909, No. 4.
- 4) Mesnil et Nicolle, Traitement des Trypanosomiasés. Annals Pasteur, Année 20, p. 417, 513.
- 5) Moore, Nierenstein and Todd, Concerning the treatment of experimental Trypanosomiasis. Ann. of Trop. Med. and Parasit., Vol. 2, 1909, No. 4.
- 6) Nierenstein, Chemotherapeutical studies of Atoxyl and Trypanocoides, Part I and II. Ann. of Trop. Med., Vol. 2, 1908—1909, No. 3, 4.
- 7) Woithe, Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte, 1908.
- 8) Levaditi et Yamanouchi, Mécanisme d'action de l'Atoxyl dans les Trypanosomiasés. Comptes rendus de la Soc. de Biol., Tome 65, 1908, p. 23.
- 9) Ehrlich, Ueber moderne Chemotherapie. Verhandl. der Deutschen dermatolog. Gesellschaft, 1908.
- 10) Dakin, Journal of Bio-Chemistry, I, (1906), p. 171, IV, (1907), p. 419, IV, (1908), p. 221, 227.  
Vergl. auch Nierenstein, Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Jahrg. 41.
- 11) Bach, Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., 1906, 1907.
- 12) Czapek, Biochemie der Pflanzen, Bd. 2, p. 487.
- 13) Friedberger, E., Ueber die Behandlung der experimentellen Nagana mit Mischungen von Atoxyl und Thioglykolsäure. Berlin. klin. Wochenschr., 1908, No. 38.

[Aus dem Georg-Speyer-Hause zu Frankfurt a. M.; Direktor:  
Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich.]

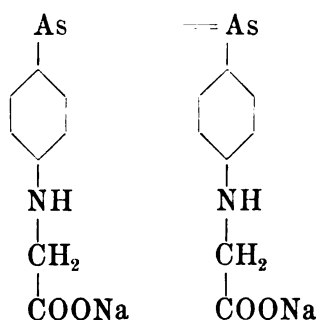
# **Heilversuche mit Arsenophenylglycin bei Trypanosomiasis.**

Von **W. Roehl.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Januar 1909.)

Wie Ehrlich in seinen Vorträgen in der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und in der Deutschen Chemischen Gesellschaft <sup>1)</sup> mitgeteilt hat, ist von uns eine große Reihe von Derivaten der Phenylarsinsäure auf ihre Heilwirkung bei experimenteller Trypanosomiasis geprüft worden.

Am wirksamsten hat sich bisher bei den verschiedenen Tierspecies und den verschiedenen Trypanosomenarten das Arsenophenylglycin erwiesen, das von Dr. Bertheim im Georg-Speyer-Hause dargestellt wurde:



Der Aufbau des Präparates erfolgte von zwei Gesichtspunkten aus:

1) war es erwünscht, eine Substanz anzuwenden, die durch den Besitz der dreiwertigen Arsengruppe eine direkte Wirkung auf die Trypanosomen auszuüben imstande wäre, und

2) mußte durch Einführung besonderer Gruppen der dem dreiwertigen Arsenrest als solchem anhaftende Charakter einer hohen Giftigkeit und starken lokalen Reizwirkung genommen werden.

1) Verhandl. d. Deutsch. Dermatol. Gesellsch. 10. Kongreß 1908; Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch., XLII, Heft 1, 1909.

Nach den früheren Mitteilungen Ehrlichs<sup>1)</sup> über die entgiftende Funktion der Säuregruppen war es das Nächstliegende, vor allem Säurederivate zur Untersuchung heranzuziehen.

Unter einer nicht geringen Zahl derartiger von uns untersuchten Verbindungen hat sich die Glycinverbindung, die durch Einführung des Essigsäurerestes in die Amidogruppe entsteht, am besten bewährt.

Das Arsenophenylglycin, das in Form des Dinatriumsalzes in Anwendung kommt, ist in Wasser spielend löslich und übt bei den meisten Tierspecies so gut wie keine Reizwirkung am Orte der Injektion aus.

Das Präparat ist interessanterweise bei den meisten Tierspecies 2—4mal ungiftiger als das Arsanilat (paramidophenylarsinsaures Natrium), wie aus der folgenden Uebersichtstabelle hervorgeht:

Vergleichende Toxicität.  
Höchste ertragene Dosis pro Kilogramm Körpergewicht.

	Arsanilat	Arsenophenylglycin
Maus	0,17	0,6
Ratte	0,17	0,4
Meerschweinchen	0,08	0,12
Kaninchen	0,07	0,22
Hund	0,01 <sup>2)</sup>	0,2 <sup>3)</sup>
Pferd		0,075 <sup>3)</sup>

Die Dosen für Maus und Ratte beziehen sich auf subkutane Anwendung. Beim Kaninchen wurde häufig wegen des bequemen und genaueren Injektionsmodus die intravenöse Einspritzung gewählt. Beim Meerschweinchen war wegen der lokalen Reizwirkung der intraperitoneale Weg notwendig.

Das Präparat ist sauerstoffempfindlich und muß daher im Vakuum aufgehoben werden, bei Sauerstoffzutritt oxydiert es sich zu giftigeren Verbindungen, insbesondere zum Paraglycin-

1) Zur therapeutischen Bedeutung der substituierenden Schwefelsäuregruppe. Therapeut. Monatshefte, März 1887.

2) Mesnil, Ann. Inst. Past., T. 22, p. 871.

3) Schilling, Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene, Januar 1909, Bd. 13, p. 1.

phenylarsenoxyd, die um ein erheblich Vielfaches toxischer sind und ähnlich wie die Arsensäure sekundäre Störungen veranlassen können, wie dies vor allem aus den interessanten Versuchen Wendelstadts<sup>1)</sup> hervorgeht. Es muß daher bei der therapeutischen Anwendung des Arsenophenylglycins ganz besonders darauf geachtet werden, daß das Präparat gleich nach Eröffnung des Vakuumröhrchens gelöst und die Lösung frisch injiziert wird.

#### Heilversuche an Mäusen.

Unsere weißen Mäuse vertragen in der Regel vom Natriumsalz des Arsenophenylglycins Lösungen von 1:70 bis 1:80 (pro 20 g Körpergewicht 1 ccm der angegebenen Lösung subkutan). Maßgebend für die ertragbare Dosis ist natürlich vor allem die chemische Reinheit des Präparates. Wir haben in den letzten Monaten eine erhebliche Zahl verschiedener Präparationsnummern auf ihre Giftigkeit geprüft. Das folgende Beispiel zeigt den Ausfall einer derartigen Toxizitätsprüfung:

Präparationsnummer 67.

Lösung	Zahl der Mäuse	tot	davon	davon Proz.
1:80	5	—	5	100
1:70	4	1	3	75
1:60	4	4	0	0

Dosierung in dieser und den folgenden Tabellen: 1 ccm der angegebenen Lösung pro 20 g Maus subkutan.

Bei der Prüfung ist es von Wichtigkeit, Mäuse von annähernd gleichem Gewicht auszuwählen, am besten solche von ca. 15 g.

Bei der Prüfung verschiedener Herstellungsnummern an mehr wie tausend Mäusen stellte sich die höchst interessante und wichtige Tatsache heraus, daß die individuelle Empfindlichkeit der Mäuse gegen das Arsenophenylglycin nur in sehr geringen Breiten variiert, während bekanntlich beim Arsanilat die Individualität der Tiere den größten Einfluß ausübt.

Ehrlich hat auf diese Erscheinung schon wiederholt hingewiesen und die Erklärung hierfür darin gefunden, daß

1) Wendelstadt, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 51.

das differente Reduktionsvermögen der einzelnen Individuen das eingeführte Arsanilat in verschiedenem Maße zu den höchst giftigen Reduktionsprodukten, speziell dem Paramidophenylarsenoxyd, umwandelt, daß also stärker reduzierende Tiere vergiftet werden.

Das Arsenophenylglycin stellt im Gegensatz zum Arsanilat ein vollkommen reduziertes Derivat der Paramidophenylarsinsäure dar, und es ist daher von vornherein ausgeschlossen, daß ihm gegenüber das verschiedene Reduktionsvermögen eine Rolle spielen kann. Dementsprechend haben wir eine auffallend große Konstanz der Giftigkeit bei den einzelnen Individuen beobachten können, und es gelingt daher, die Toxizität eines gegebenen Präparates mit verhältnismäßig großer Genauigkeit zu limitieren.

Es ist natürlich für eine erfolgreiche Therapie von der größten Bedeutung, mit einer konstanten Giftigkeit eines Medikamentes rechnen zu können. Immerhin wird man auch hier, wie überall, auf das Vorkommen singulärer Idiosynkrasien rechnen müssen.

Das Ideal einer Therapie ist es ja nun, wenn man mit einem Schlage mit solchen Dosen endgültig heilen kann, die das Leben noch nicht gefährden können: die *Therapia sterilisans magna*.

Dies leistet das Arsenophenylglycin bei der Trypanosomiasis der Mäuse. Zur Infektion diente in unseren Versuchen in der Regel ein seit Jahren im Institut fortgepflanzter Naganastamm, „Ferox“. Subkutan infizierte Mäuse zeigen am 1. Tage nach der Impfung Trypanosomen in geringer Zahl im Blute, am 2. Tage meist sehr reichlich, sie sterben gewöhnlich 60 bis 70 Stunden nach der Infektion.

Am 1. Tage nach der Infektion, also bei bereits manifester Blutinfektion, gelingt es leicht, die Mäuse mit einer einzigen Injektion dauernd zu heilen. Die dafür erforderlichen Dosen betragen nur den 5.—7. Teil der höchsten ertragenen Dosis.

Die folgende Tabelle gibt einen Versuch wieder, in dem eine Reihe von infizierten Mäusen 24 Stunden nach der Infektion mit fallenden Dosen von Arsenophenylglycin behandelt wurde; sogar eine Lösung von 1 : 1000 hatte noch einen aus-

gesprochen trypanoziden Effekt, so daß die Trypanosomen auf 5 Tage aus dem Blute verschwanden.

Behandlung von Nagana-Mäusen mit fallenden Dosen von Arsenophenylglycin am 1. Tage nach der Infektion.

Maus	Lösung	Blutbefund		Resultat
1	1:1300	nicht	parasitenfrei	tot am 5. Tag
2	1:1000	5 Tage	"	" " 10. "
3	1:750	9 "	"	" " 14. "
4	1:650	5 Monate	"	dauernd geheilt
5	1:550	5 "	"	" "
6	1:300	5 "	"	" "

Zum Vergleich wurde zur gleichen Zeit eine Reihe von Versuchen mit Arsanilat angestellt. Der verwendete Stamm war etwas leichter beeinflussbar als der hier vor 2 Jahren von Browning benutzte.

Behandlung von Nagana-Mäusen mit fallenden Dosen von arsanilsaurem Natrium am 1. Tage nach der Infektion.

Lösung	Anzahl der Mäuse	Rezidive	Heilungen	Vergiftet	Geheilt Proz.
1:200	9	1	2	6	22
1:250	5	2	1	2	20
1:300	5	1	2	2	40
1:400	2	1	—	1	0
1:550	2	2 <sup>1)</sup>	—	—	0

Es geht aus der Tabelle hervor, daß man beim Arsanilat überhaupt keine Dosis besitzt, die mit Sicherheit heilt und mindestens für den Durchschnitt der Mäuse ungefährlich wäre, während, wie gesagt, das Arsenophenylglycin noch mit dem 5. Teile der regelmäßig ertragenen Dosis am 1. Tage nach der Infektion dauernde Sterilisierung des Körpers herbeiführt.

Weit schwieriger ist es natürlich, mit einer einmaligen Injektion Mäuse am 2. Tage nach der Infektion, d. h. wenige Stunden vor dem Tode, dauernd zu heilen. Man muß bedenken, daß man es hier mit kranken Tieren zu tun hat, die gegen das Medikament weit empfindlicher sind als normale Tiere. Es können daher hier bei den größeren Dosen schon Vergiftungen auftreten.

1) Blut nie parasitenfrei.

Um so interessanter ist es daher, daß es auch unter diesen so ungünstigen Bedingungen noch gelingt, mit noch ungefährlichen Dosen bei einmaliger Injektion vollkommene Sterilisierung zu erreichen. Das zeigt die folgende Tabelle:

Behandlung von Nagana-Mäusen mit fallenden Dosen von Arsenophenylglycin am 2. Tage nach der Infektion.

Lösung	Anzahl der Mäuse	Rezidive	Heilungen	Gestorben	Geheilt Proz.
1:600	4	4	—	—	0
1:400	5	1	4	—	80
1:300	7	2	5	—	71
1:250	5	—	5	—	100
1:200	5	—	5	—	100
1:150	9	—	8	1	89

Es sind also bei Behandlung mit Lösungen 1:150 bis 1:250 von 19 Mäusen 18 dauernd geheilt worden, und bei der einen am Tage nach der Behandlung mit der höchsten Dosis (1:150) gestorbenen Maus muß es zweifelhaft bleiben, ob sie einer Vergiftung erlag, oder ob nicht die lebensrettende Intervention zu spät erfolgte.

In der Tat gelang es uns wunderbarerweise noch, Tiere, die schon schlaff waren und sich kühl anfühlten, selbst durch Dosen von 1:600 wieder munter und vorübergehend parasitenfrei zu machen, so daß sie erst dem später eintretenden Rezidiv erlagen.

Aber durch Dosen von 1:250 — und das ist erst der dritte Teil der vom gesunden Tier noch ertragenen Dosis — konnten wir schwer kranke Tiere mit einem Schlage vollkommen sterilisieren und also dauernd heilen. Das ist in der Tat ein glänzendes Beispiel der „Therapia sterilisans magna“.

Zum Vergleich mit Arsanilat mag erwähnt sein, daß es hiermit selbst bei schwächerer Infektion und sogar bei Tieren, die noch die Dosis 1:150 ertrugen, in keinem einzigen Falle gelang, Heilung mit einer Injektion am 2. Tage nach der Impfung zu erreichen.



**Prophylaktische Wirkung bei Mäusen.**

Es ist bekannt, daß die Schutzwirkung der meisten trypanoziden Agentien nur sehr gering ist, da sie meist rasch wieder aus dem Körper ausgeschieden werden.

Dagegen hätte man erwarten können, daß solche Substanzen, die lange im Körper retiniert werden, auch eine lange Schutzwirkung auszuüben imstande wären. Ehrlich und Shiga haben jedoch schon beim Trypanrot gezeigt, daß seine Schutzwirkung nur gering ist und eine Infektion 24 bis 48 Stunden nach der einmaligen Vorbehandlung angeht, allerdings mit 23—24-tägiger Verzögerung. Sie bezogen das Ausbleiben starker prophylaktischer Wirkung auf die Fixierung des Farbstoffes in den Geweben und sein ziemlich rasches Verschwinden aus dem Kreislauf.

Auch unter den Derivaten des Arsanilats fanden wir einen dunkelorange gefärbten Stoff, das Trioxybenzylidenarsanilat (aus Phloroglucinaldehyd und Arsanilat), das eine viele Monate anhaltende Orangefärbung der Haut hervorruft. Seine Heilwirkung bei trypanosomenerkrankten Mäusen ist besonders bei mehrmaliger Injektion verhältnismäßig gut. So wurden am 2. Tage nach der Infektion, also bei sehr starker Blutinfektion von 9 Mäusen 5 endgültig geheilt, 1 hatte ein Rezidiv, 3 wurden vergiftet. Die Behandlung bestand in dreimaliger Injektion einer Lösung 1:150. Die genaueren Behandlungsergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

I. Trioxybenzylidenarsanilat bei Nagana-Mäusen am 1. Tage nach der Infektion.

a) Einmalige Behandlung.

Dosis	Zahl der Mäuse	Rezidive	Heilungen	Vergiftungen
1:600	1	1	—	—
1:450	1	1	—	—
1:300	1	1	—	—
1:200	1	—	1	—
1:150	1	—	—	1
1:100	5	2	1	1
1:80	2	—	1	1

Blut nur  
1 Tag  
parasitenfrei

## b) Mehrmalige Behandlung.

Bei 3 Mäusen in 4 Tagen je eine Injektion der Lösungen

$$\left. \begin{array}{l} 1:450 \\ 1:300 \\ 1:150 \end{array} \right\} \text{ alle 3 geheilt}$$

Bei 3 Mäusen in 5 Tagen

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ Injektion von } 1:450 \\ 1 \text{ „ „ } 1:350 \\ 2 \text{ Injektionen „ } 1:150 \end{array} \right\} \text{ alle 3 geheilt}$$

## II. Trioxybenzylidenarsanilat bei Nagana-Mäusen am 2. Tage nach der Infektion.

Dosis	Zahl der Injektionen	Zahl der Mäuse	Rezidive	Heilungen	Vergiftungen
1:75	1	2	—	1	1
1:100	1	2	1	1	—
1:150	3	9	1	5	3
1:200	1	2	1	1	—
1:150	2				

Gerade von diesem Derivat des Arsanilats hätte man daher wohl am ehesten eine anhaltende Schutzwirkung erwarten können. Zu unserer Ueberraschung stellte sich jedoch heraus, daß es nicht einmal 24 Stunden lang die Mäuse gegen die Infektion schützen kann.

## Trioxybenzylidenarsanilat präventiv bei Nagana-Mäusen.

Tage nach der Vor- behandlung	1	2	3	4	5	6	7	Kontrollen	
	Dosis 1 : 100								
1	inf.	.	.	.	.	.	.	inf.	inf.
2	—	inf.	inf.	inf.	inf.	.	.	+	+
3	+	+	—	inf.	inf.	.	.	+++	+++
4	+	+	+	—	+	inf.	inf.	+++	+++
5	++	++	+	+	+	+	+	tot	tot
6	+++	+++	+++	+	++	++	++	.	.
7	tot	tot	tot	+++	tot	+++	+++	.	.
8	.	.	.	tot	.	tot	tot	.	.

Erklärung: Zahl der Trypanosomen im Blute: — keine; + wenige; ++ viele; +++ sehr viele.

Daß dem einfachen Arsanilat keine prophylaktische Wirkung zukommt, ist von allen Untersuchern übereinstimmend festgestellt worden und geht insbesondere aus den Versuchen Uhlenhuths hervor.

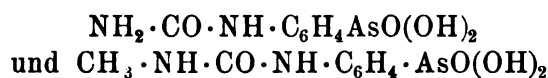
Daß auch das Arsacetin (acetylparamidophenylarsinsaures Natron) nach einmaliger Injektion kaum eine Schutzwirkung erkennen läßt, zeigt die folgende Tabelle.

Arsacetin prophylaktisch bei Nagana-Mäusen.

Tage nach der Vorbehandlung	1	2	3	4	5	6	Kontrollen	
	Dosis 1 : 25							
1	inf.	.	.	.	.	.	inf.	inf.
2	—	inf.	inf.	.	.	.	+	+
3	+	+	+	inf.	inf.	.	+++	+++
4	++	++	++	+	+	inf.	tot	tot
5	+++	+++	+++	++	++	+	.	.
6	tot	tot	tot	+++	+++	+++	.	.
7	.	.	.	tot	tot	tot	.	.

Es war also selbst bei den 24—48 Stunden nach der Vorbehandlung infizierten Mäusen die Infektion nur um 1 bis 2 Tage gegenüber den Kontrollen verzögert worden.

Auch die beiden bei trypanosomeninfizierten Mäusen so ausgezeichnet wirksamen Harnstoffderivate der Phenylarsinsäure:



zeigten keine präventive Wirkung, wie die folgende Tabelle am Beispiel des Methylharnstoffderivates zeigt.

Methylharnstoffphenylarsinsäure prophylaktisch.

Tag nach der Vorbehandlung	1	2	Kontrolle
	Dosis 1 : 20		
1			
2	inf.	inf.	inf.
3	+	+	+
4	++	++	+++
5	+++	+++	tot
6	tot	tot	

Im Gegensatz zu den genannten trypanoziden Stoffen besitzt das Arsenophenylglycin eine verhältnismäßig lange andauernde Schutzwirkung. Die folgende Tabelle zeigt, wie nach einer einmaligen Injektion einer Lösung 1:150 noch 4 Tage später eine deutliche Schutzwirkung zu erkennen ist, da das Blut der Maus eine Woche lang parasitenfrei

bleibt, und wie die Infektion 2 Tage nach der Vorbehandlung sogar völlig negativ ausfällt und die Maus überhaupt nicht erkrankt.

Prophylaktische Wirkung des Arsenophenylglycins bei Nagana-Mäusen.

Tag nach der Vorbehandlung	1	2	3	4	Kontrolle
	Dosis 1 : 150				
1	.	.	.	.	.
2	inf.	.	.	.	inf.
3	—	inf.	.	.	+
4	—	—	inf.	.	+++
5	—	—	—	inf.	tot
6	—	—	—	+	
7	—	—	—	+	
8	—	—	—	+++	
9	—	—	—	tot	
10	—	+	—		
11	—	++	—		
12	—	+++	+		
13	—	tot	+++		
14	—		tot		
	Infektion negativ		.		

Auch Schilling fand eine gleiche prophylaktische Wirkung des Arsenophenylglycins bei seinem Naganastamm: von 4 Mäusen, die 24 Stunden nach Injektion von 5 mg infiziert wurden, erkrankte keine einzige, von 4 Mäusen, 48 Stunden nach der Vorbehandlung geimpft, blieb 1 trypanosomenfrei, die 3 anderen erkrankten nach verlängerter Inkubationszeit.

Noch günstiger war die prophylaktische Wirkung in den Versuchen Schillings bei Ratten, indem hier sämtliche 4 Tiere auch noch bei Infektion 48 Stunden nach der Vorbehandlung parasitenfrei blieben, und selbst 72 Stunden später von 4 Ratten nur 2 erkrankten und die beiden anderen gesund blieben.

**Feste Stämme.**

Aus unserem Ausgangsstamm „Ferox“ war vor mehr als 3 Jahren ein arsanilfester Stamm abgeleitet und durch dauernde Behandlung mit Arsanilat und Arsacetin ad maximum gefestigt und auf dieser Höhe der Festigkeit erhalten worden. Dieser Arsenstamm I ist in Mäusen und Ratten vollkommen fest gegen die höchstens anwendbaren Dosen von Arsacetin.

Um so erstaunlicher ist es, daß man auch mit diesem Stamm infizierte Mäuse durch einmalige Injektion von Arsenophenylglycin dauernd heilen kann, ja man braucht bei Mäusen kaum höhere Dosen für diesen Stamm zu nehmen als für den Ausgangsstamm.

Arsenstamm I bei Mäusen mit Arsenophenylglycin behandelt.

Tag nach der Infektion	1	2	3	Kontrolle
1	inf. + $\frac{1}{750}$	inf. + $\frac{1}{500}$	inf. + $\frac{1}{400}$	inf. +
2	—	—	—	+++
3	—	—	—	tot
4	—	—	—	.
5	—	—	—	.
6	—	—	—	.
7	—	—	—	.
8	—	—	—	.
9	+	—	—	.
10	+++	—	—	.
11	tot	—	—	.
12	.	—	—	.
150	.	—	—	.
		geheilt	geheilt	

Diese theoretisch und praktisch gleich wichtige Tatsache findet nach Ehrlich darin ihre Erklärung, daß der Arsenrezeptor der Trypanosomen seine Avidität gegenüber den Derivaten der Arsanilsäure nur so weit eingebüßt hat, daß er in der Maus von Arsanilat und Arsacetin nichts mehr zu binden vermag. Dagegen ist die Avidität noch vollkommen ausreichend, um die Verankerung des stärker aviden Arsenophenylglycins zu ermöglichen.

Der Beweis dafür, daß in der Tat Arsacetin und Arsenophenylglycin einen gemeinsamen Rezeptor im Trypanosomenprotoplasma besitzen, ließ sich dadurch erbringen, daß wir von Ausgangsstamm Ferox einen Stamm ableiteten, der allmählich gegen Arsenophenylglycin gefestigt wurde. Dieser Stamm gewann dadurch gleichzeitig eine hohe Festigkeit gegen Arsacetin.

Vom Arsenstamm I ausgehend, haben wir durch Behandlung mit Arsenophenylglycin den Arsenstamm II erhalten, der also vollkommen fest gegen das Glycin ist, aber noch von Antimon und arseniger Säure beeinflusst wird.

Wir fanden jedoch, daß es unter besonderen Umständen auch gelingt, allein durch Behandlung mit Arsenophenylglycin einen Stamm fest gegen Antimon zu machen. Es handelte sich um einen Stamm, der gleichzeitig fest war gegen Parafuchsin, Trypanblau und Arsacetin, und den wir weiterhin mit Arsenophenylglycin gefestigt hatten. Diese letztere Behandlung, die nur sehr allmählich zum Ziele führte, hatte am Schlusse das Resultat, daß der Stamm nicht nur fest gegen Arsenophenylglycin, sondern auch antimonfest geworden war.

Daß es auch gelang, vom Arsenstamm II ausgehend, durch Behandlung mit arseniger Säure einen Stamm zu züchten, der dann vollkommen fest gegen Antimon und Wismut war, Arsenstamm III, ist bereits von Geheimrat Ehrlich mitgeteilt worden.

#### Kaninchenversuche.

Außerordentlich glänzend sind die Heilversuche mit Arsenophenylglycin bei Kaninchen. Diese Tiere sind gegen das Arsenikale nicht sehr empfindlich, da intravenös Dosen von 0,22 g pro Kilogramm Tier noch ertragen werden, wie die Tabelle zeigt:

Dosis pro kg Tier	Gewicht	Resultat	Bemerkung
0,3 g	1920	tot am 6. Tag	
0,27 "	1980	" " 8. "	
0,24 "	1600	" " 5. "	
0,23 "	1750	" " 4. "	
0,22 "	1750	am Leben	100 g Gewichtsverlust
0,21 "	2100	" "	kein "
0,18 "	1850	" "	" "

Kleinere Tiere von ca. 1000 g Körpergewicht vertragen, wie Herr Prof. Friedberger uns mitteilte und wir bestätigen konnten, noch relativ höhere Dosen, so wurden von unserem Tiermaterial noch Dosen von 0,26 g pro kg Tier ertragen.

Es hat sich bei den Heilversuchen nun gezeigt, daß man keineswegs auf hohe, lebensgefährdende Dosen angewiesen ist, es gelingt vielmehr, bereits mit dem 3.—4. Teile der Dosis letalis sichere Heilung mit einer einmaligen Injektion zu erreichen, selbst der 6. Teil hat noch in der Regel, wenn auch nicht immer, geheilt.

Nagana-Kaninchen, intravenös mit einer einmaligen Injektion von Arsenophenylglycin behandelt.

Dosis pro kg Tier	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive	Geheilt Proz.
0,125 g	3	3	—	100
0,08 „	6	6	—	100
0,06 „	6	6	—	100
0,04 „	5	4	1	80
0,03 „	2	1	1	50
0,02 „	1	—	1	0

Unbehandelte, mit unserem Ferox-Stamm infizierte Kaninchen gingen in 1—3 Monaten unter den bekannten Erscheinungen ein: Schwellungen der Ohren, des Gesichtes, speziell der Augenlider, der Genitalien etc. Spontane Heilungen haben wir bei diesem Stamme nie gesehen. Die Behandlung begannen wir stets erst, wenn deutliche Krankheitssymptome auftraten, und die Beobachtung galt als abgeschlossen, wenn 6 Monate nach der Behandlung weder Krankheitserscheinungen auftraten noch Mäuse erkrankten, die mit 1 ccm Blut subkutan geimpft waren. Doch haben wir einzelne Kaninchen auch bis zu 12 Monaten in Beobachtung gehalten.

Wir haben uns nicht darauf beschränkt, nur Kaninchen mit eben deutlichen Krankheitssymptomen zu behandeln, sondern auch ganz schwer kranke Tiere mit einer einzigen Injektion dauernd geheilt. Hier sei besonders ein Kaninchen erwähnt, das 2 Monate nach der Infektion ganz schwer erkrankt war: der ganze Kopf machte einen unförmigen Eindruck, die Nase war geschwollen, die Atmung röchelnd, vor dem linken Auge bestand ein großes eiterndes Geschwür, die Augenlider waren so stark geschwollen, daß man kaum noch etwas vom Bulbus sehen konnte, dazu die Ohren ödematös, Geschwüre auf dem Rücken und an den Hinterpfoten. 8 Tage nach der Injektion von Arsenophenylglycin (0,08 g pro kg) war der Heileffekt schon deutlich, das Tier war munter, die Schwellungen zurückgegangen, und ein ausgedehnter Haar- ausfall markierte deutlich alle vorher entzündeten Hautpartien. Die Heilung ging ohne irgendwelche Behandlung immer weiter, das große Geschwür vor dem linken Auge reinigte sich allmählich und heilte endlich nach einigen Monaten aus

unter Hinterlassung einer Narbe, die ein Ektropium des unteren Augenlides bedingte. Ein Rezidiv trat nicht auf (12 Monate nach der Behandlung).

Auch haben wir Kaninchen geheilt, deren Hoden tiefgehend ulceriert war, in einem Falle trat eine spontane Abstoßung eines ulcerierten und vereiterten Hodens ein (Behandlung mit einer intravenösen Injektion von 0,06 g pro kg), doch verloren wir auch einige Tiere, bei denen sich bereits eine eitrige Peritonitis vom Hoden ausgehend entwickelt hatte.

Das Ziel der therapeutischen Bestrebungen ist es natürlich, mit möglichst kleinen Dosen Heilung zu erreichen, und wir haben daher die Einzeldosis noch weiter verringert, aber mehrmals wiederholt. In der Tat gelingt es, bei einem derartigen Vorgehen, noch mit der Dosis 0,02 g pro kg sicher zu heilen, wenn man die Injektion im Verlauf von 6 Tagen 3mal wiederholt, dagegen ist 0,01 g pro kg, auch bei 6-maliger Wiederholung, im Heilresultat inkonstant.

Wiederholte Injektionen kleiner Dosen von Arsenophenylglycin bei Nagana-Kaninchen.

Dosis	Anzahl der Injektionen	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive
0,02 g	3	3	3	—
0,015 „	3	1	1	—
0,01 „	4—6	5	3	2

Rezidive, die nach ungenügenden Dosen von Arsenophenylglycin oder anderen Arsenikalien auftraten, konnten wir regelmäßig mit einer einmaligen Injektion von Arsenophenylglycin dauernd heilen, und zwar ebenso leicht wie die primäre Erkrankung: von 12 Rezidivkaninchen, die mit einer einzigen Injektion von 0,06—0,1 g pro kg behandelt wurden und 6 Monate lang in Beobachtung blieben, erkrankte kein einziges zum zweiten Male; sie waren dauernd geheilt und ihr Blut trypanosomenfrei.

Uebrigens haben wir auch eine Anzahl Kaninchen mit den Trypanosomen der Dourine und des Mal de Caderas infiziert und ebenfalls leicht mit Arsenophenylglycin heilen können.



Dourine-Kaninchen, mit Arsenophenylglycin behandelt mit einmaliger Injektion.

Dosis	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive
0,1 g	2	2	—
0,08 „	2	1	1
0,06 „	2	2	—

Das eine beobachtete Rezidiv wurde mit einer einmaligen Injektion von 0,12 g pro kg Tier endgültig geheilt.

Mal-de-Caderas-Kaninchen, mit Arsenophenylglycin mit einmaliger Injektion behandelt.

Dosis	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive
0,1 g	1	1	—
0,08 „	2	2	—
0,06 „	2	2	—

Arsanilat ist dagegen bei unserem Ferox-Stamm nur ausnahmsweise imstande, Kaninchen mit einer Injektion zu heilen. Mit der höchsten ertragenen Dosis von 0,05 g pro kg Tier trat bei einem Kaninchen völlige Heilung ein, doch hatte das Tier noch keine Krankheitssymptome (sogenannte Präventivbehandlung). Sonst traten selbst bei Präventivbehandlung nach den Dosen 0,05—0,032—0,025 g pro kg stets Rezidive ein.

Arsenophenylglycin dagegen heilt, wie gesagt, erkrankte Tiere noch mit dem dritten bis vierten Teile der höchstertragbaren Dosis mit Sicherheit.

Wir haben ferner Kaninchen mit unserem Arsenstamm I infiziert und Heilversuche mit Arsenophenylglycin angestellt. Ebenso wie bei den Mäusen zeigte es sich, daß man auch bei Kaninchen diesen festen Stamm mit Hilfe des Glycins abtöten kann. Aber es waren hierfür größere Dosen erforderlich als für den gewöhnlichen Feroxstamm. Immerhin heilte noch die Hälfte der Dosis minima letalis sicher bei einmaliger Injektion.

Arsenfester Stamm I bei Kaninchen, mit einmaliger intravenöser Injektion von Arsenophenylglycin behandelt.

Dosis pro kg Tier	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive
0,15 g	2	2	—
0,125 „	2	2	—
0,1 „	2	1	1
0,08 „	2	—	2
0,06 „	1	—	1

43\*

Von den Rezidiven haben wir 3 wieder mit Arsenophenylglycin (0,12 g pro kg) behandelt und alle drei durch einmalige Injektion endgültig geheilt.

Es zeigte sich also bei den Kaninchen, daß man für den Arsenstamm I zur Heilung etwa das Doppelte der Dosis benötigt, wie für den Ausgangsstamm, während bei Mäusen der Arsenstamm sich gegen Arsenophenylglycin ungefähr ebenso verhielt wie der Ausgangsstamm. Bei Ratten fand Wendelstadt, ähnlich wie wir bei Kaninchen, ebenfalls eine gewisse Festigkeit des Arsenstammes I gegen Arsenophenylglycin.

#### Meerschweinchenversuche.

Ganz besondere Schwierigkeiten zeigten sich bei der Behandlung von Meerschweinchen. Diese Tierspecies ist nach unseren Erfahrungen und denen nahestehender Fachkollegen das ungünstigste Heilobjekt.

Zunächst sind diese Tiere gegen Arsenophenylglycin empfindlicher als Mäuse, Ratten und Kaninchen. Bei subkutaner Injektion fanden wir in einer Versuchsreihe, daß

0,2 g pro kg in 4 Tagen

0,16 " " " " 9 " tötete

und ein Tier mit 0,12 " " " zwar mit dem Leben davonkam, aber eine starke Gewichtsabnahme von 450 g auf 330 g erlitt und erst 2 Monate nach der Injektion sein Anfangsgewicht wieder erreichte.

Außerdem zeigen Meerschweinchen nach subkutaner Injektion des Arsenophenylglycins in der Regel Indurationen, die zu Hautnekrosen führen können.

Wir haben daher bei den Meerschweinchen den intraperitonealen Weg vorgezogen und ihn bei den Heilversuchen ausschließlich angewendet. Auch hier ist 0,125 g pro kg Tier eine hohe Dosis, der bereits einige Tiere erliegen können. Bei trypanosomenkranken Tieren kann sogar 0,1 zuweilen tödlich sein.

Die Heilresultate gehen aus der folgenden Tabelle hervor:

Nagana-Meerschweinchen, behandelt mit einmaliger intraperitonealer Injektion von Arsenophenylglycin.

Dosis pro kg	Zahl der Tiere	Heilungen	Rezidive	Vergiftungen
0,1	3	2	—	1
0,08	6	5	1	—
0,07	4	2	2	—
0,06	3	1	2	—
0,04	3	—	3	—

Es gelingt also, mit der stets ertragenen Dosis von 0,08 pro kg Tier die überwiegende Mehrzahl der Meerschweinchen mit einer einzigen Injektion dauernd zu heilen, aber das Resultat ist kein absolut sicheres. Es mag bemerkt sein, daß die meisten Tiere zur Zeit der Behandlung enorme Mengen von Parasiten im Blute zeigten.

Die unbehandelten Kontrollen starben etwa 8 Wochen nach der Infektion, und es wechselte während des Krankheitsverlaufes der Parasitenbefund im Blute.

Das Meerschweinchen stellt also für die Heilung mit Arsenophenylglycin die ungünstigste Tierspecies dar, da die Dosis therapeutica nahe an der Dosis toxica liegt.

Dagegen hat sich bei Mäusen, Kaninchen, Ratten und auch Affen<sup>1)</sup> das Arsenophenylglycin als ein wahres Heilmittel erwiesen, hier gelingt in der Tat die „Therapia sterilisans magna“.

#### Zusammenfassung.

1) Das Arsenophenylglycin heilt mit Sicherheit bei einmaliger Injektion ungefährlicher Dosen selbst schwere Trypanosomenkrankungen bei Mäusen und Kaninchen. Meerschweinchen waren schwerer heilbar.

2) Die prophylaktische Wirkung des Arsenophenylglycins, an Mäusen geprüft, ist anhaltender als die der übrigen bekannten Trypanosomenheilmittel und erstreckt sich auf einige Tage.

3) Ein gegen arsanilsaures Natrium und Arsacetin vollkommen fester Trypanosomenstamm konnte bei Mäusen und Kaninchen leicht durch Arsenophenylglycin abgetötet werden, doch waren beim Kaninchen hierfür größere Dosen erforderlich als für den nichtfesten Ausgangsstamm.

---

1) Wendelstadt, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 51.

[Aus der biologisch-chemischen Abteilung (Prof. v. Dungern) des Krebsinstituts Heidelberg (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. Czerny, Exzellenz) und der biologischen Abteilung des Berliner städt. Krankenhauses „Am Urban“ (Prof. Leonor Michaelis).]

### **Untersuchungen über die antifermentative, besonders die antitryptische Wirkung des Blutserums.**

Von **Georg Eisner** (Heidelberg).

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Februar 1909.)

Die Fähigkeit des Blutserums, Fermentwirkungen hemmend zu beeinflussen, ist schon viele Jahre bekannt. Als erster hatte Hammarsten im Jahre 1887 gefunden, daß Kasein, durch Pferdeblutserum verunreinigt, mit Lab nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden konnte. Das gleiche Resultat trat ein, als er statt Kasein Kuhmilch verwendete. Rödén stellte auf Grund dieser Befunde Versuche an und konnte eine Hemmung der Labgerinnung durch Pferdeblutserum sicher feststellen. Auch fand er schon, daß nicht jedes Serum gleich starke Wirkung hatte, daß ferner nicht die Formbestandteile des Serums Träger der hemmenden Stoffe sind. Alkohol und Temperaturen von 70° zerstörten die Hemmung. Er untersuchte dann andere Tiersera auf diese hemmende Fähigkeit und konnte sie auch bei Schweineserum, Rinderserum und Kaninchenserum, wenn auch in schwächerem Maße, feststellen, ebenso bei Ascitesflüssigkeit. Rödén wie Hammarsten zeigten auch, daß es nicht eine Veränderung des Kaseins ist, welche die Gerinnung verhindert, da später noch Gerinnung eintreten konnte, sondern daß die Hemmungserscheinung auf das Serum zurückgeführt werden muß. Was sie so für Serum außerhalb des Körpers festgestellt hatten, konnte Hildebrand 1893 auch für zirkulierendes Blut beweisen. Er injizierte einem Kaninchen Labfermentlösung und Milch. Die Wirkung der Gerinnung äußerte sich dann im Auftreten von Kaseingerinnseln, die ins Herz und die Gefäßstämme gerieten und dort schwere Erscheinungen hervorriefen. Daß eine Hemmung des Blutes dabei vorhanden war,

ließ sich daran erkennen, daß zur Gerinnung größere Labmengen nötig waren als im Reagenzglas ohne Blutzusatz.

Die Lehre von der Antifermentwirkung des Blutserums wurden in der Folgezeit von vielen Autoren bestätigt und sehr erweitert. Nicht nur die verschiedenen Fermente, sondern auch die Sera der verschiedensten Tiere wurden unter den verschiedensten Bedingungen daraufhin geprüft. Fermi und Pernossi fanden eine Hemmung des tryptischen Ferments durch die Organsäfte und das Blut, mit der von Fermi genauer erprobten und zur quantitativen Bestimmung sehr empfohlenen Gelatinemethode. Camus und Gley, Pugliese und Coggi und viele andere bestätigten diese Resultate. Mathes fand eine Hemmung des Pepsins, Hahn eine solche des Trypsins, Pepsins und Labferments durch Hundebutserum.

Hildebrand gelang es zuerst, durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit steriler Fermentlösung Antiferment hervorzurufen, und zwar mit Emulsin. v. Dungern beobachtete, daß gegen eiweißspaltende Bakterienfermente, die Gelatine verflüssigen, Antikörper gebildet werden, die sich im Blutserum nachweisen lassen. Es zeigte sich, daß normales Blutserum schon die peptonisierenden Bakterienfermente und ebenso Pankreatin hemmt, daß aber der hemmende Einfluß der Sera von Tieren, die mit Fermenten vorbehandelt waren, ein viel größerer ist. Dabei ließ sich auch eine Spezifität solcher Antifermentwirkungen zeigen. Ein Serum eines an Osteomyelitis, also einer Staphylokokkeninfektion, Leidenden hemmte Staphylokokkenferment 20mal so stark, als normales Serum, während die Hemmung auf Choleravibrionenferment 9mal geringer, auf das der Finklerschen Vibrionen 18mal geringer war. Morgenroth immunisierte dann Tiere gegen Lab. Er erzeugte nämlich eine hemmende Eigenschaft des Serums gegen Lab künstlich bei Tieren, deren Serum normalerweise gar nicht oder nur weniger hemmte, indem er sterilisierte Labfermentlösung subkutan injizierte. So fand er bei Ziegen, daß das Blut erhöht hemmenden Einfluß auf die Labgerinnung nach der Behandlung mit Ferment zeigte. Was Morgenroth und unabhängig von ihm etwa zu gleicher Zeit Briot für das Labferment nachgewiesen hatte, konnte

Achalmé eine Reihe von Jahren später für das Trypsin bestätigen. Er injizierte sterile Pankreatinlösungen Meerschweinchen intraperitoneal und fand die normale Hemmungskraft des Blutserums dieser Tiere bedeutend gesteigert. Bei 56° wurde sie wieder schwächer, um bei 65—70° aufgehoben zu werden. Damit wurde die von Rödén gefundene Thermolabilität auch bestätigt. Analoge Resultate erhielt Sachs für Pepsin. Bergmann und Bamberg fanden nach subkutaner Injektion von Trypsin bei Hunden nach 2 Monaten eine Verdoppelung der antitryptischen Kraft, nach Implantation einer Pankreasdrüse in die Bauchhöhle wurde von ihnen schon nach 24 Stunden eine Steigerung des Antitrypsingehaltes im Blutserum festgestellt.

Man glaubte sich auf Grund all dieser Befunde zu der Annahme berechtigt, daß die antifermentative Wirkung auf einer spezifischen Beeinflussung der betreffenden Fermente durch wirkliche Antikörper beruht, auf der Vereinigung beider Substanzen zu einer neuen unwirksamen Verbindung. Während zunächst Fuld und Spiro anderer Ansicht waren und für das Antilab an eine Entziehung der zur Gerinnung nötigen Kalksalze durch das Pseudoglobulin glaubten, in der Weise, daß das Parakasein sich mit dem Kalk der Milch nicht mehr zu dem unlöslichen Parakaseincalcium vereinigen kann, ließen sie diese Erklärung nach den Ausführungen von Korschun fallen und bekehrten sich zu seiner Ansicht. Dieser zeigte an Versuchen, daß von einer Kalkentziehung nicht die Rede sein könne, daß vielmehr die Hemmungskörper Eigenschaften wirklicher Antikörper besitzen. Einen Beweis dafür glaubt er unter anderem durch den Nachweis erbracht zu haben, daß ihm eine Immunisierung mit Hilfe von Anti-Antilab gelang nach Analogie des von Wendelstadt angegebenen Anti-Antikörpers für Blutegelextrakt. Im Pferdeserum ist also ein spezifisches Antilab vorhanden, das auf Lab in gleicher Weise wirkt, wie Antitoxin auf Toxin. Neben dem Antilab fand er noch ein Pseudoantilab, das beim Erhitzen nicht vernichtet wurde.

Auf eine gröbere Schwankung in der Antifermentwirkung haben Ascoli und Bezzola zuerst aufmerksam gemacht, nachdem allerdings schon Rödén und alle weiteren Forscher darauf hingewiesen hatten, daß die normale Antifermentkraft

von Tier zu Tier, noch mehr von Species zu Species schwanke. Ascoli und Bezzola beobachteten nämlich, daß die anti-tryptische Kraft des Blutserums in konstanter Weise bei croupöser Pneumonie schwanke, und zwar konnten sie bei 15 untersuchten Fällen eine konstante Kurve aufstellen, wonach ein erstes Stadium mit erheblicher Steigerung, das einige Zeit lang sich auf gleicher Höhe hält, von einem zweiten Stadium des Abfalls, das meist mit dem Abklingen der lokalen Erscheinungen Hand in Hand geht, zu unterscheiden ist.

Nachdem im Jahre 1906 von Müller und Jochmann<sup>1)</sup> eine einfache Methode zum Nachweis proteolytischer Fermente angegeben worden war, mit der durch Dellenbildung auf Serum- oder Löfflerplatten die Fermentwirkung bequem zu erkennen und auch quantitativ zu bestimmen war, ist durch diese beiden Autoren und durch ihre Mitarbeiter Bittorf, Wiens, Kolaczek und Ziegler das proteolytische Leukocytenferment und sein Antiferment im Blutserum eingehend erforscht worden. Das Trypsin und Antitrypsin ist erst vor kurzem zuerst durch Marcus mit dieser Plattenmethode geprüft worden, dann genauer durch Brieger und Trebing. Da aber nach den neuesten Untersuchungen von Jochmann und Kantorowicz, wie ich weiter unten noch ausführen werde, bestimmt an eine sehr nahe Verwandtschaft, wahrscheinlich sogar an eine Identität beider Fermente zu denken ist, so ist es auch erlaubt, alle bei der Untersuchung des Leukocytenfermentes gefundenen Tatsachen für die Beurteilung der tryptischen Ferment- und Antifermentwirkung zu benutzen.

Müller und Jochmann hatten im Gegensatz zu Erben und Schumm nachgewiesen, daß alle polynukleären Leukocyten, auch im normalen Blut, Träger eines tryptischen Fermentes seien, welches beim Zerfall der Zellen frei wird und erst dann wirken kann. Damit war auch die bekannte Erscheinung erklärt, daß der Eiter aller auf Ansammlung polynukleärer Leukocyten beruhenden Entzündungen proteo-

1) Etwa zu gleicher Zeit konnten Stern und Eppenstein völlig unabhängig von den Müller-Jochmannschen Untersuchungen durch die Gelatineverflüssigungsmethode nach Fermi die gleichen Befunde aufweisen.

lytische Eigenschaften zeigt, während bei kalten Abszessen tuberkulöser Natur, die auf Ansammlung lymphoider Zellen<sup>1)</sup> beruhen, keine Verdauungserscheinungen nachweisbar sind, wenn nicht gelapptkernige Leukocyten beigemischt sind. Es wurde ferner die Hemmung dieses nach Pappenheim nur bei Menschen, Affen und Hunden vorhandenen, an die gelapptkernigen Leukocyten<sup>2)</sup> gebundenen Fermentes durch einen thermolabilen Hemmungskörper im Serum der verschiedensten Säugetiere festgestellt, und zwar konnte bewiesen werden, daß das Serum von Affe und Hund, die solche Leukocyten besitzen, stärkere Hemmung aufweise, als das niederer Tiere, z. B. Meerschweinchen und Kaninchen, während Vogelserum überhaupt keine größere Hemmung zeigte. Zum Teil decken sich diese Angaben mit denen von Opie und Barker, zum Teil treten sie deren Annahme entgegen. Müller und Jochmann untersuchten auch Reptilien-, Amphibien- und Fischsera und kamen nun, da sie hier ebenfalls ein Fehlen von antifermentativen Stoffen feststellen konnten, und da sie bei allen diesen Tieren ebenso wie bei den Vögeln annähernd den gleichen Eiweißgehalt im Serum fanden, wie bei den hemmenden Sera der Säugetiere, die Hemmung aber gerade an den Eiweißgehalt<sup>3)</sup> geknüpft sein mußte, zu der Annahme, daß diese durch einen ganz spezifischen Körper, durch ein wirkliches Antiferment, bedingt sei.

Nachdem also Ascoli und Bezzola bei ihren Untersuchungen des Antifermentgehaltes im Blutserum bei croupöser

1) Nach ganz neuen Untersuchungen von Bergel ist an diese Zellen ein lipolytisches Ferment gebunden.

2) Wahrscheinlich ist nach dem Ausfall von Erbens Versuchen, der durch Bebrütung die Zellen nur bis auf den Kern zerstörte und dabei schon Verdauungserscheinungen beobachtete, und nach Müllers Beobachtung, daß die Kerne sich beim Untergang der Zellen lange hielten, das absterbende Protoplasma Verdauung zeigte, das Ferment an das Protoplasma gebunden.

3) Im Einklang mit Opie und Barker fand nämlich Müller mit der Hofmeisterschen Methode durch fraktioniertes Ausfällen des Eiweißes mit Ammoniumsulfat, daß die Hemmungskraft des Blutserums nicht an die Globulin-, sondern an die Albumingruppe gebunden sei, denn nach völliger Ausfällung des Albumins schwindet auch die Hemmungskraft, die aber nicht von den Albuminen im ganzen, sondern von einer spezifischen, albuminartigen Substanz abhängig ist.



Pneumonie zuerst auf ein Schwanken desselben bei Krankheitszuständen aufmerksam gemacht hatten, wurden von K o l a c z e k, B i t t o r f, W i e n s und mehreren anderen diese Versuche wiederholt und fortgesetzt. W i e n s prüfte insbesondere eine große Reihe der verschiedensten Krankheitsgruppen und will überall dort, wo ein vermehrter Leukocytenverfall, also eine größere Fermentbildung, mit den Krankheitserscheinungen einhergeht, verminderten Antitrypsingehalt im Serum beobachtet haben und erklärt diese Befunde damit, daß ein Teil der schon normalerweise vorhandenen antifermentativen Stoffe durch das vermehrte Ferment abgesättigt wird. Jedoch reicht diese Erklärung nicht für die vielen Widersprüche in seinen eigenen Resultaten aus, noch viel weniger stimmen aber seine Befunde mit den Untersuchungen anderer, die vor und nach seinen angestellt wurden, überein. Jedenfalls geht aus allem hervor, daß der Antitrypsingehalt resp. Antileukocytenfermentgehalt in den verschiedenen Krankheiten größeren Schwankungen unterworfen ist. Nachdem Marcus, der, ohne von der Identität von Trypsin und proteolytischem Leukocytenferment zu wissen, als erster Trypsin als Testobjekt statt des bisher verwendeten Eiters bei der Müller-Jochmannschen Plattenmethode einführte, ungefähr eine Uebereinstimmung seiner Befunde mit den durch die bisher angewandte Methode gefundenen Resultaten festgestellt und dabei besonders die verstärkte Trypsinhemmung durch das Serum eines Krebskranken gefunden hatte, wurden Brieger und Trebing hierdurch veranlaßt, diese Erscheinung genauer zu prüfen. Sie untersuchten eine große Reihe von Carcinomfällen und fanden in der überwiegenden Zahl eine deutliche Vermehrung der antitryptischen Kraft des Serums, so daß sie, obwohl sie auch bei vielen andern Erkrankungen vermehrte Trypsinhemmung beobachteten und besonders ihnen selbst schon aufgefallen war, daß gerade bei Kachexie eine dem Grade derselben entsprechende Erhöhung der Hemmung auftrat, doch hierin ein unterstützendes differentialdiagnostisches Moment sehen wollten. Durch die vielen hierdurch veranlaßten Nachuntersuchungen von Bergmann und Bamberg, Wiens, Schulz und Chiarolanza, Jochmann und Kantorowicz, Bergmann und Meyer, Klieneberger und

Scholz, Herzfeld, und auch die weiteren Untersuchungen von Brieger und Trebing selbst wurde sicher festgestellt, daß die zuerst von ihnen in Anspruch genommene diagnostische Verwendung der Antifermenterhöhung im Serum für Carcinom nicht angängig sei, daß diese vielmehr als sekundäre Erscheinung nur bei solchen Krebsfällen zu finden ist, die schon Kachexie aufweisen, daß sie überhaupt bei allen kachektischen Vorgängen, die ja mit Organeinschmelzung und vermehrtem Körpereiweißumsatz verbunden sind, auftritt.

Bevor ich auf die Erklärung der Antitrypsinerhöhung eingehe, will ich erst die von mir untersuchten Fälle selbst mitteilen. Ursprünglich von der Absicht ausgehend, nur die von Brieger und Trebing aufgestellte Behauptung einer Fermenterhöhung bei Carcinom nachzuprüfen, habe ich mich durch die Resultate der zur Kontrolle benutzten Sera anderer Krankheitszustände und die inzwischen veröffentlichten Nachuntersuchungen veranlaßt gesehen, eine größere Zahl der verschiedenartigsten Erkrankungen auf diese Reaktion hin nachzuprüfen, und habe, wie schon erwähnt, durchaus die Annahme, daß die Antitrypsinreaktion nur von der Gewebseinschmelzung resp. von dem damit stets einhergehenden Leukocytenverfall oder auch nur von diesem allein abhängig ist, bestätigt gefunden. Leider konnte ich die zu untersuchenden Fälle nicht nach Wunsch zusammenstellen, da es schon mit Schwierigkeiten verknüpft war, eine größere Anzahl Sera zur Untersuchung zu erhalten. Dank dem Entgegenkommen einiger Herren Assistenten der inneren Abteilung des Berliner städtischen Krankenhauses am Urban und der inneren Klinik der Universität Heidelberg, sowie Herrn Dr. Werners (vom Krebsinstitut Heidelberg) Bemühung habe ich 74 verschiedene Sera prüfen können, aus denen doch genügend zur Beurteilung der Antitrypsinerhöhung zu ersehen ist.

Von der großen Zahl der zur quantitativen Bestimmung von tryptischen Fermenten zur Verfügung stehenden Methoden, die der Natur des Fermentes entsprechend alle auf dem Prinzip beruhen, daß Eiweißstoffe verdaut werden, probierte ich die von Fermi empfohlene Gelatineverflüssigungsmethode und die Serum- oder Löffler-Plattenmethode nach Müller-Jochmann aus und wählte zunächst die letztere, ihrer mannig-

fachen Vorzüge wegen, gab sie aber bald doch wieder auf, da sie nicht die Genauigkeit hat wie die darauf von mir verwendete, von Fuld angegebene Methode der Kaseinausfällung mit Essigsäure. Obwohl die Plattenmethode unbestreitbar große Vorzüge hat<sup>1)</sup>, so stimme ich mit Klieneberger und Scholz und Bergmann und Meyer doch völlig überein, wenn sie die Müller-Jochmannsche Methode nicht für ganz zuverlässig halten wegen der nicht konstanten Zusammensetzung der Serumplatten, der mit Oesen nicht möglichen exakten Mischung von Serum und Ferment und wegen der unbeständigen Fermentlösungen bei Anwendung von Eiter als Testobjekt<sup>2)</sup>. Bergmann und Meyer behaupten auch, daß die von Brieger und Trebing benutzte Temperatur von 55° nicht gleichgültig sei, da sowohl Ferment als auch Antiferment abgeschwächt würde, und zwar beide nicht in gleichem Maße, so daß in ihrem Verhältnis eine Verschiebung eintrete<sup>3)</sup>. Sie wählten daher ebenfalls die von Fuld angegebene, von Gross beschriebene Methode der Kaseinfällung, die auch von L. Michaelis unabhängig davon zu Versuchen über Trypsin angewendet war. Ich glaube auch, daß es mir gelungen ist, eine durchaus exakte Versuchsanordnung, bei der alle Fehlerquellen ausgeschaltet sind, angestellt zu haben. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß Kasein, welches in schwach alkalischer Flüssigkeit leicht löslich ist, im Gegensatz zu seinen Verdauungsprodukten bei Ansäuern mit Essigsäure aus dieser Lösung wieder ausfällt.

---

1) 1. Die Temperatur von 55° erlaubt völlig steriles Arbeiten ohne Zusatz irgendwelcher Desinficientien und beschleunigt den chemischen Vorgang. 2. Es ist möglich, mit äußerst geringen Mengen des zu untersuchenden Serums schon Versuche anzustellen. 3. Die leichte Demonstrierbarkeit infolge der leichten Erkennung der Dellen. 4. Das gleichzeitige Ansetzen mehrerer Versuche auf einer Platte.

2) Bei Benutzung von konstanten Trypsinlösungen ist der letzte Punkt auszuschalten.

3) Inzwischen ist, nach Abschluß dieser Arbeit, von Marcus eine Veröffentlichung erschienen, in der er Verbesserungsvorschläge zur Plattenmethode für die Bestimmung der antitryptischen Kraft des Serums macht, die im wesentlichen die oben genannten Punkte berücksichtigen (Berliner klin. Wochenschr., 1909, No. 4).

Ich bereitete mir am Tage vor der anzustellenden Untersuchung jedesmal eine 1-proz. Pankreatinlösung (Rhenania, Aachen), die 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt und dann filtriert wurde, da Pankreatin sich bekanntlich schwer löst. Die Fermentlösung wurde vor ihrer Benutzung stets auf ihre Stärke mit Serum von bekannter Hemmungskraft geprüft und nur verwendet, wenn sie die gleiche Verdauungskraft zeigte wie die frühere. Ich bekam also durch Anwendung stets gleich starker Lösungen den Vorteil, sämtliche Versuche, die im Verlauf mehrerer Monate angestellt wurden, ohne Umrechnung direkt vergleichen zu können. Ich setzte nun zu jeder Untersuchung eine Reihe mit folgenden Fermentmengen an: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 ccm.

Bei unbekannten Seris mußte ich die ganze Reihe aufstellen, bei bekannten konnte ich bei der Nachuntersuchung, je nach der gefundenen Hemmungskraft, die ersten oder die letzten Röhrchen fortlassen. Die Abstufungen von 0,05 ccm in den ersten Röhrchen waren nötig, um eine verhältnismäßig geringe Erhöhung genauer bestimmen zu können; bei stärker hemmenden Seris ist ein Unterschied von 0,05 belanglos. Zu dem Ferment wurde zunächst je 0,05 ccm des zu untersuchenden Serums zugefügt. Ich ließ dieses Gemisch 10 Minuten bei Zimmertemperatur zusammen, damit das Serum sich mit dem Ferment binden und so seinen hemmenden Einfluß geltend machen konnte. Es hatte sich nämlich in Vorversuchen gezeigt, daß die Hemmung größer war, wenn das Serum einige Zeit auf das Ferment eingewirkt hatte. Nach mehr als 10 Minuten zeigte sich aber kein Unterschied mehr. Es wurden dann in jedes Röhrchen 5 ccm einer  $\frac{1}{8}$ -promill. Kaseinlösung gefüllt, die zur völligen Lösung mit wenigen Tropfen einer 20-proz. Sodalösung schwach alkalisiert war. Ich verwendete diese sehr dünne Lösung, um einen allmählichen Uebergang von dem Röhrchen mit völliger Trübung zu dem mit völliger Verdauung auszuscheiden, wie er bisher bei allen Untersuchungen mit dieser Methode aufgetreten ist, da dort stets dickere Kaseinlösungen angewendet wurden. Bei dieser äußerst dünnen Lösung jedoch ist in den 5 ccm so wenig Kasein vorhanden, daß die Differenz von 0,05 resp. 0,1 ccm der Fermentlösung ausreicht, um in einem Röhrchen Ver-

dauung eintreten zu lassen, während diese im vorhergehenden überhaupt noch nicht begonnen hat. Ich habe also den Vorteil, in jeder Reihe eine scharfe Grenze feststellen zu können. Nach Zufügung der Kaseinlösung und Umschütteln wurden die Röhrchen auf 20 Minuten in ein Wasserbad von 38°, der für die Fermentwirkung geeignetsten Temperatur, gesetzt. Danach wurde der Verdauungsprozeß durch Ansäuern mit 1/2 ccm einer 1-promill. Essigsäurelösung momentan unterbrochen. Die antitryptische Kraft des untersuchten Serums war nun leicht zu bestimmen, indem ich das erste Röhrchen, in dem kein Niederschlag mehr eingetreten war, nahm, in welchem also die Fermentmenge enthalten war, die eben die antitryptische Kraft überwinden konnte. Ich fand bei normalen Sera den Titer zwischen 0,1 und 0,15 und konnte danach die Erhöhung der Hemmung bestimmen. Um jede Zufälligkeit in den Resultaten auszuschließen, untersuchte ich jedes Serum öfter und habe mit wenigen Ausnahmen gleiche Werte gefunden. Die Sera wurden eingefroren aufbewahrt, da sich zeigte, daß so der Antifermentgehalt ziemlich lange konstant bleibt und erst nach einigen Wochen abnimmt, eine Erscheinung, auf die schon Morgenroth bei seinen Untersuchungen über das Antilab aufmerksam gemacht hat.

Tabelle I.

1.	Herr Schu.	Serum 3 Monate eingefroren	0,1
			(unter normal)
2.	Herr Die.	Ca. ventriculi	5. Sept. 0,5
			8. " 0,5
			15. " 0,4
3.	Herr Gü.	Ca. hepatis	8. " 0,4
			16. " 0,4
			25. " 0,25
4.	Herr Bu.		1. " 0,2
			19. " 0,2
			8. Okt. 0,15
5.	Herr Tra.	Lues	8. Sept. 0,15
			2. Okt. 0,15
			8. " 0,1
			14. " 0,1
6.	Frau Val.	Ca. oesophagi	28. " 0,4
			4. Nov. 0,4
			14. " 0,3
			18. " 0,25

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, daß eingefrorene Sera eine Zeit lang die gleiche Hemmungskraft behalten,

während dies bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur nicht der Fall ist; dagegen zeigen fast alle Sera eine deutliche Abnahme der hemmenden Stoffe nach einigen Wochen. Eine Erhöhung ist nie beobachtet worden.

Tabelle II. Normale Sera.

1. Herr Kr.	30 Jahre	0,2	7. Herr So.	67 Jahre	0,2
2. " Schu.		0,1	8. " Kri.		0,15
3. " Ku.	54 "	0,2	9. " Ei.	23 "	0,15
4. " Be.		0,15	10. " Ja.	22 "	0,15
5. " Da.	38 "	0,15	11. " Schw.	20 "	0,1
6. " Ko.		0,1	12. " Bu.	58 "	0,2

Die Hemmungskraft normaler Sera schwankt zwischen 0,1 bis 0,15 ccm; bei einigen sind sogar 0,2 ccm Fermentlösung zur Ueberwindung der antitryptischen Kraft nötig.

Tabelle III. Sichere Krebsfälle.

13. Herr Ka.	62 Jahre	Ca. der Gallengänge, Kachexie	0,3
14. " Gü.	70 "	Ca. hepatis, Kachexie	0,4
15. " Di.	70 "	Ca. ventriculi, sehr kachektisch, kurz vor dem Exitus	0,5
16. " Ka.	62 "	vergl. No. 13, 4 Wochen später. Kachexie weiter vorgeschritten	0,4
17. Frau Va.	43 "	Ca. oesophagi, starke Kachexie	0,4
18. " Rh.	42 "	Ca. mammae sin., keine Kachexie	0,2
19. " Ku.	43 "	Ca. mammae, Kachexie	0,15
20. Fräul. Goe.	27 "	Ca. recti, Kachexie	0,25
21. Herr Ha.	62 "	Ca. ventriculi, Kachexie	0,3
22. " Al.	52 "	Ca. cardiae, keine Kachexie	0,25
23. Frau Gla.	48 "	Ca. hepatis, Kachexie	0,25
24. Herr Hei.	63 "	Ca. faciei, keine Kachexie, nur lokale Erkrankung	0,15
25. " Gru.	51 "	Ca. auriculi sin., mäßige Kachexie	0,25
26. Frau Wer.	72 "	Ca. der Kopfhaut, Kachexie	0,15

Die Hemmungskraft dieser Sera ist fast durchweg erhöht. Doch besteht, wie leicht ersichtlich ist, ein bestimmter Zusammenhang zwischen dem Allgemeinzustand und der Höhe des Antifermentgehaltes. Bei stark kachektischen ist dieser viel höher als bei solchen Krebskranken, deren Leiden noch im Anfang ist, und deren Allgemeinbefinden noch nicht sehr gelitten hat. Die Sera No. 13 und 16 bieten den besten Beweis hierfür. Es handelt sich um denselben Patienten. Das zweite Mal ist das Serum 4 Wochen später untersucht

und zeigt, parallel dem Fortschreiten des Verfalles, auch höhere tryptische Hemmungskraft. No. 19 und 26 zeigen trotz Kachexie allerdings keine Erhöhung. Die Resultate von Brieger und Trebing sind somit auch hierdurch bestätigt. Es spricht dies für die Brauchbarkeit beider Methoden. Doch während Brieger und Trebing ebenso wie Bergmann und Meyer in der erhöhten Hemmungskraft des Serums Krebskranker ein unterstützendes differentialdiagnostisches Moment erblicken wollen, kann ich ihnen hierin nicht zustimmen, da die Reaktion durchaus nicht spezifisch ist, sondern stets bei Kachexie auftritt. Ein differentialdiagnostisches Hilfsmittel soll aber gerade im Beginn einer Erkrankung anwendbar sein, und hier ist die Erhöhung des Antitrypsin-gehaltes, die ja mit dem allgemeinen Körper- und Kräfteverfall Hand in Hand geht, meist noch gar nicht oder nur in geringem Grade vorhanden. Ist die Kachexie schon deutlich erkennbar, so hat solch diagnostisches Moment keinen praktischen Wert mehr, abgesehen davon, daß ja nicht nur die Krebskachexien die Reaktion zeigen. Aus den folgenden Tabellen sind die Resultate zu ersehen, die ich bei Untersuchung einer Reihe der verschiedenartigsten Erkrankungen erhielt.

Tabelle IV. Verschiedene Tumoren.

27.	Herr Eb.	20 Jahre	multiple maligne Lymphome, Kachexie	0,4—0,5
28.	Frau Li.	32 „	Sarkom der Ferse mit Metastasen, mäßige Kachexie	0,2
29.	Frau Tru.	38 „	Sarkom der Vagina, Metastasen an Uterus und Ovarien, Kachexie	0,25—0,3
30.	Frau Hö.	25 „	Lues (Wassermann positiv), Tumor cerebri	0,15

Tabelle V. Lues und postluetische Erkrankungen.

30.	Frau Hö.	25 Jahre	Lues (W. +), Tumor cerebri	0,15
31.	Herr To.		Lues (W. +)	0,1
32.	„ Tr.		Lues (W. +)	0,15
33.	„ Ri.	56 „	Lues vor 25 Jahren (W. +), starke Kachexie, Rückenmarkserkrankung?	0,5
34.	„ Chri.	41 „	Lues (W. +)	0,15
35.	Frau Fi.	64 „	Lues	0,15
36.	„ Ar.	52 „	Lues tertiär	0,15
37.	„ Zi.	34 „	Tabes dorsalis	0,15

Tabelle VI. Fieberhafte und entzündliche Erkrankungen mit allgemeinem Körperverfall.

38.	Frau Ko.	59 Jahre	Tuberkulöse Peritonitis und Adnex-entzündung, zeitweise Kachexie	0,25
39.	Herr He.		Pneumonie	0,4
40.	Fräul. Thi.	17 "	Typhus abd.	0,3
41.	Herr Bo.	24 "	Lungentuberkulose	0,3
42.	Fräul. Hey.	9 "	Ostitis oder Tuberkulose der Tibia	0,3
43.	Herr Hei.		Pneumonie	0,4
44.	" Klo.	45 "	Proctitis ulcerosa	0,4—0,5
45.	" He.		Typhus abd.	0,5
46.	" Schm.	31 "	Typhus abd.	0,4
47.	Fräul. Frei.		Typhus abd. oder Sepsis	0,3
48.	Herr We.		Typhus abd.	0,25
49.	" Schw.	39 "	Wurstvergiftung, Fieber	0,2
50.	" Kl.	48 "	Bronchitis chron., Arteriosklerose, Kachexie	0,4
51.	" La.	30 "	Polyarthrititis	0,2
52.	Frau Lö.	25 "	Brechdurchfall	0,4
53.	Herr Fri.		Chronische Nephritis	0,25
54.	" Be.		Myelitis	0,25
55.	" Kl.	60 "	Lungentuberkulose, starke Kachexie	0,5
56.	Frau Kö.	36 "	Typhus abd.	0,4
57.	" Me.	26 "	Mastitis (in Besserung)	0,2
58.	Herr Ao.	30 "	Proctitis ulcerosa (in Besserung)	0,15
59.	" Pfl.	38 "	Nephritis subacuta	0,15
60.	" Gi.	43 "	Enteritis chronica	0,2
61.	" Ho.	40 "	Tbc. pulmonum, Kachexie	0,25
62.	" Le.	44 "	Tbc. pulmonum et laryngis	0,25
63.	" Ad.	24 "	Tbc. pulmonum, Fieber	0,3
64.	" Pl.	24 "	Tbc. pulmonum, Pleuritis, anämisch	0,3
65.	" Pfe.	21 "	Tbc. pulmonum, im Beginn	0,15
66.	" Ro.	21 "	Tbc. pulmonum, im Beginn	0,15
67.	Frau Fi.		Urämie mit schlechtem Allgemeinzustand	0,4
68.	" Ro.	58 "	Perniciöse Anämie, Kachexie	0,2—0,3

Tabelle VII. Verschiedene andere Krankheiten.

69.	Herr St.	22 Jahre	Ulcus ventriculi	0,15
70.	" We.	25 "	Unbestimmte Magenerkrankung	0,15
71.	" St.	30 "	Ulcus ventriculi	0,15
72.	" Rö.		Lebercirrhose	0,15
73.	" Re.	33 "	Nervöses Magenleiden	0,15
74.	" Bru.	29 "	Perniciöse Anämie	0,15

Betrachtet man diese Tabellen, so fällt sofort wieder auf, daß zwischen Allgemeinzustand und Antitrypsingehalt im Blutserum ein offener Zusammenhang besteht. Ueberall, wo Gewebseinschmelzung, Körpereweißzerfall stattfindet, beobachtet man die erhöhte Hemmung. So findet sich diese in Tabelle IV wieder dem Grad der Kachexie parallel gehend. Weniger vorgeschrittene Fälle zeigen geringere Antiferment-



erhöhung. In Tabelle V ist durchweg normale oder eher verminderte Hemmung gefunden, eine Erscheinung, die Briegers Befunde bei luetischen Kranken bestätigt. Nur No. 34 zeigt entsprechend dem schlechten Allgemeinzustand starke Hemmung. Dagegen fand ich in der folgenden Gruppe fast durchweg mehr oder minder starke Vermehrung, ebenfalls wieder dem körperlichen Befinden parallel gehend. In der letzten Gruppe sind Krankheitsfälle untersucht, die keinen Körperverfall aufweisen; sie zeigen alle normale Hemmung. Erst kürzlich ist von Fürst experimentell an Meerschweinchen nachgewiesen, daß mit zunehmendem Korpereiweißzerfall auch die Antitrypsinmenge im Blute steigt, und es ist kein Grund, beim Menschen eine andere Erklärung zu suchen.

Im wesentlichen stimmen also die so gefundenen Resultate mit denen früher angestellter Untersuchungen überein. Ein besonderer diagnostischer Wert kann, wie auch von anderen Seiten bemerkt ist, der Reaktion keineswegs zugesprochen werden, da sie bei einer großen Reihe von Erkrankungen vorhanden ist und auch noch zu viel unaufgeklärte Faktoren mitsprechen. Bessert sich z. B. eine fieberhafte Erkrankung, so nimmt auch der Antitrypsingehalt wieder ab, und es liegt die Vermutung nahe, daß dieser im Verlauf akuter fieberhafter Krankheiten in einer bestimmten Kurve schwankt, die dem klinischen Verlauf der betreffenden Krankheit entspricht. Nähere Versuche hierüber hat Wiens schon früher angestellt; er ist zu dem Resultat gekommen, daß die Schwankungen der Hemmungskraft bei akuten Krankheiten sich häufig gesetzmäßig verhalten.

Wie ist nun das Zustandekommen der Reaktion zu erklären? Bei der Gewebseinschmelzung findet sicher ein Freiwerden einer vermehrten Menge tryptischen Fermentes statt, so daß die erhöhte Hemmung dieses Fermentes wohl als Reaktion auf diese Erscheinung angesehen werden könnte, wenn auch die Möglichkeit besteht, daß nebenher, ganz unabhängig von der Fermentbildung, auch eine Bildung hemmender Stoffe einhergeht. Unter diesem Gesichtspunkt würde die vermehrte Hemmung bei allen fieberhaften Zuständen, wo ebenfalls Leukocytose, damit im Zusammenhang vermehrter Leukocytenzerfall und Freiwerden vermehrter Fermentmengen

vorhanden ist, ebenso wie bei lokalen eitrigen Entzündungen, die nebenbei auch allgemeine Leukocytose hervorrufen, leicht zu erklären sein. Auffallend wäre dann allerdings die Tatsache, daß die Sera Typhuskranker stets hohe antitryptische Kraft zeigen, während hier doch eine Leukopenie, eine Verminderung der gelapptkernigen Leukocyten, auftritt; doch könnte hier der Zerfall zahlreicher Leukocyten in den Organen, besonders in der Milz, angeführt werden; auch ist vielleicht die Leukocytenanhäufung bei den Darmgeschwüren nicht gleichgültig. Dagegen würden die Befunde bei Tuberkulose eine einfache Lösung finden. Im Anfang, wo der Gewebszerfall noch nicht eingetreten ist, findet sich auch keine Erhöhung der antitryptischen Kraft (No. 65 und 66), hingegen bei den klinisch vorgeschritteneren Fällen 41, 55, 61, 62, 63, 64 wohl. Der tuberkulöse Prozeß an sich läßt, da vor allem lymphoide Zellanhäufungen stattfinden, kein tryptisches Ferment frei werden. Daher erst Antifermentvermehrung, wenn durch sekundären Gewebszerfall sich Kachexie zeigt. Diese Gewebs-einschmelzung bei tuberkulösen Prozessen ist nach Fr. Müller aber auch wieder das Werk polynukleärer Leukocyten, deren freiwerdendes Ferment die abgestorbenen Gewebsmassen durch Verdauung verflüssigt. Die normale Hemmungskraft von Fall 57 und 58 ließe sich dadurch erklären, daß die Erkrankungen zur Zeit der Blutentnahme schon fast völlig wieder abgeheilt waren.

Jedenfalls haben wir nebeneinander einen vermehrten Leukocytenzerfall resp. Körpergewebseinschmelzung mit Freiwerden vermehrter Mengen eines tryptischen Fermentes einerseits und Auftreten vermehrter antitryptisch wirkender Stoffe im Blut andererseits, und wenn auch der Beweis, daß die zweite Erscheinung als Reaktion auf die erste eintritt, daß also ein ursächlicher Zusammenhang besteht, fehlt, so liegt doch die Vermutung nahe, daß es sich um den gleichen Vorgang wie bei der künstlichen Immunisierung mittels von außen zugeführter Fermente handelt, wie sie von Morgenroth für Lab, von Achalmé zuerst für Trypsin ausgeführt ist. Wir könnten dann auch die hemmenden Stoffe als wirkliche Antikörper, als Antifermente ansehen. Daß es sich auch hier um eine spezifische Reaktion gegen ein frei werdendes

Ferment handelt, daß also beim Gewebsuntergang tryptisches Ferment frei wird, ist nach den Ausführungen von Jochmann und Kantorowicz sowie Jochmann und Lockemann möglich. Man kann mit ihnen annehmen, daß das proteolytische Leukocytenferment und das tryptische Pankreasferment ebenso wie die beiden Antifermente sicher außerordentlich nahestehende, höchstwahrscheinlich identische Körper sind; denn sie fanden nach Injektion von Leukocytenferment bei Kaninchen nicht nur den Antileukocytenfermentgehalt, sondern auch den Antitrypsingehalt in gleicher Weise vermehrt und erklärten hierdurch auch die Tatsache, daß das Blut von Tieren, die nach Jochmann und Müller kein Leukocytenferment haben, doch gegen menschlichen Eiter antifermentative Wirkung zeigen, durch das Vorhandensein des Pankreastrypsins. Da ferner in Abszessen, also an Orten, wo das Leukocytenferment tätig ist, die gleichen Verdauungsprodukte gefunden worden sind, wie im Darm beim Abbau von Eiweißstoffen durch das Pankreastrypsin, schließlich die Thermolabilität beider Fermente und Antifermente die gleiche ist, kann kaum noch ein Zweifel bestehen, daß die beiden in Frage kommenden Fermente identisch oder doch so nahe verwandt sind, daß ein eventueller Unterschied belanglos wäre. Wir haben nun also, ebenso wie bei der künstlichen Immunität, vermehrte Zufuhr eines tryptischen Fermentes und die gleiche Erscheinung wie dort, nämlich vermehrten Antitrypsingehalt im Blutserum. Müller und Jochmann haben sich hierdurch zu der Annahme für berechtigt gehalten, den Vorgang als eine echte Antikörperbildung anzusehen. Doch kann ich mich ihnen nicht ohne weiteres anschließen, da doch nicht genau die gleichen Verhältnisse wie bei künstlicher Einführung von Fermenten vorliegen. Ein sicherer Beweis, daß eine Antikörperreaktion gegen Stoffe, die vom eigenen Organismus geliefert werden, möglich ist, ist bisher noch nicht erbracht worden. Diese Annahme würde nur dadurch bewiesen, daß Fermente, aus dem Körper eines Tieres gewonnen, dem gleichen Tiere wieder eingeführt würden und auch dann die spezifische Antifermentreaktion verursachten. Der Befund Glässners, daß nach der Verdauung, also zu einer Zeit, wo vermehrte Sekretion von Pankreastrypsin und Leukocytose stattgefunden

hat, eine Antitrypsinerhöhung im Blutserum sich zeigt, spricht direkt gegen diese Annahme, da nach allem, was bisher von der Antikörperbildung bekannt ist, eine solche innerhalb weniger Stunden nicht möglich ist. Der Gedanke, daß es sich vielleicht bei dem Körperversfall um eine Verminderung der Körperflüssigkeit und dadurch um eine Konzentration der im Serum schon normal vorhandenen Stoffe handle, konnte gleich wieder fallen gelassen werden, da im ungünstigsten Falle sich das Blut um ein Viertel seiner Menge eindicken kann, die Hemmungskraft des Serums aber aufs Drei- bis Vierfache erhöht beobachtet worden ist. Dann müßte auch gegen alle Fermente, deren Wirkung von normalem Blut beeinträchtigt wird, sich in gleicher Weise Hemmung zeigen. Man kann aber doch an eine Veränderung der Blutbeschaffenheit allgemeinerer Art denken. Es könnte der vermehrte Gehalt an gelösten Eiweißstoffen z. B. die Ursache sein. Diese würden dann von dem Ferment verdaut und dabei die Verdauung des Kaseins ablenken. Allerdings müßte dann auch eine gleich starke Hemmung anderer eiweißzersetzender Fermente nachweisbar sein, z. B. des Pepsins. Auch könnte es sich um Substanzen im Blut handeln, die, wie z. B. das Cholestearin, alle Fermente hemmend beeinflussen. Es ist daher von großem Interesse, zu erfahren, ob die Antitrypsinerhöhung ein spezifischer Vorgang ist oder ob auch andere Fermente in gleicher Weise beeinträchtigt werden, ob eventuell sogar eine Parallelität in der Hemmungskraft gegen die verschiedensten Fermente zu beobachten ist.

Ich habe nach dieser Richtung hin Versuche angestellt, indem ich Sera, deren tryptische Hemmungskraft bekannt war, auf ihre hemmende Kraft gegenüber mehreren anderen Fermenten, Lab, Pepsin, Emulsin und Lipase, untersuchte. Ich konnte feststellen, daß eine Parallelität der Hemmungskraft nicht vorhanden ist, daß diese Fermente zum Teil durch die betreffenden Sera überhaupt nicht in erhöhtem Maße gehemmt werden, zum Teil gerade die Sera, die Trypsin stark hemmen, es bei den anderen Fermenten weniger tun. Es handelt sich also augenscheinlich um völlig verschiedene Vorgänge. Näheres ist aus den Versuchen selbst zu ersehen.

**A. Labferment.**

Zur quantitativen Bestimmung der Antilabwirkung benutzte ich zunächst eine sehr einfache Methode, indem ich zu einer Lablösung das zu untersuchende Serum und nach 10 Minuten eine verdünnte, mit Calciumacetat vermischte Milchlösung zusetzte. Die Zeit bis zum Eintreten der Gerinnung nahm ich als Kriterium und fand in Uebereinstimmung mit Pfeleiderer und Lörcker, daß diese sich annähernd umgekehrt proportional der zugesetzten Labmenge verhielt. Auch schien zunächst eine gewisse Uebereinstimmung der Labhemmung und Trypsinhemmung vorhanden zu sein. Bei näheren Untersuchungen zeigten sich jedoch vollkommen abweichende Resultate, die miteinander in gar keine Beziehung zu bringen waren. Schon Morgenroth ist diese große Labilität des Labfermentes, auf welche die widersprechenden Resultate offenbar zurückzuführen sind, aufgefallen, und er fand nach vielen Versuchen eine Methode, die exakt vergleichbare quantitative Bestimmungen zuläßt. Sie besteht darin, daß man die Einwirkung einer nicht labilen „Standardlablösung“ auf die Milchlösung bei einer Temperatur von  $0-8^{\circ}$  24 Stunden lang vor sich gehen läßt. Hierbei zeigen sich keine sichtbaren Veränderungen. Dann setzt man die Mischungen in ein Wasserbad von etwa  $35^{\circ}$ , in dem je nach der zugesetzten Labmenge die Gerinnung sofort oder später auftritt. In 2 bis 3 Stunden spätestens ist eine feste Grenze, das für die Gerinnung eben noch genügende Labminimum, festgestellt.

Nachdem ich mit der ersten Methode nur sich widersprechende Resultate erhalten hatte, wandte ich auch die von Morgenroth empfohlene Methode an. Ich bereitete mir nach seinen Angaben eine Standardlösung, indem ich mir eine 2-proz. Lablösung (Grübler, Leipzig), in gleichen Teilen 10-proz. Kochsalzlösung und Glyzerin herstellte, und zwar so, daß ich erst 3 Tage lang das Lab mit etwas Kochsalzlösung extrahierte, dann die Lösung fertigstellte und einige Tage im Schüttelapparat ließ. Nachdem darauf im Eisschrank der ungelöste Rest sedimentiert war, wurde die klare Flüssigkeit in dunkle Flaschen gefüllt. Kühl aufbewahrt, soll sich diese Standardlösung  $1\frac{1}{2}$  Jahre unverändert halten. Von dieser machte ich mir für die Versuche die nötigen Verdünnungen

mit physiologischer Kochsalzlösung, welche, auch nach Morgenthau's Angabe, mit Neutralrot schwach gefärbt und mit dünner Essigsäure ein wenig angesäuert wurde, da Lab gegen Alkali sehr empfindlich ist. Die benutzte Milchlösung bestand aus 10 ccm Milch, 175 ccm Aq. dest., 15 ccm einer  $3\frac{1}{3}$ -proz. Calciumacetatlösung und war mit wenigen Tropfen Chloroform geschüttelt, damit sie länger konstant bliebe. Es wurden nun folgende Reihen angesetzt:

je 1 ccm verschieden verdünnter Lablösung, je 0,05 ccm Serum, je 5 ccm Milchlösung.

## I.

	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{30000}$
a) Kontrolle ohne Serum *)	+	+	+	+	+	—	—	—
b) Serum (Trypsinhemmung 0,15)	+	+	—	—	—	—	—	—
c) Serum (Trypsinhemmung 0,4)	+	+	—	—	—	—	—	—

Es zeigt sich bei diesen groben Verdünnungsunterschieden:

- 1) Eine Hemmung der Labwirkung durch Serum ist vorhanden.
- 2) Es besteht kein Unterschied zwischen Trypsin stark und schwach hemmenden Seris.

## II.

	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$
a) Serum Gü. (Trypsinhemmung 0,3)	+	+	+	+	—	—
b) Serum Di. (0,5)	+	+	+	—	—	—
c) Serum To. (0,15)	+	+	+	—	—	—
d) Serum Tr. (0,15)	+	+	+	—	—	—
e) Serum Ro. (0,2—0,3)	+	+	+	—	—	—

Auch hier ist kein wesentlicher Unterschied in der Labhemmung der einzelnen Sera, vor allem aber keine Parallelität mit der Trypsinhemmung, da Serum IIa, welches Trypsin sehr stark hemmt, hier die schwächste Antilabwirkung zeigt.

## B. Pepsin.

Als zweites Ferment wählte ich das dem Lab nahestehende Pepsin<sup>3)</sup>. Ich verwendete eine 1-proz. Pepsinlösung (Pepsin,

1)  $\frac{1}{10}$  ccm der 2-proz. Lablösung auf 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung,  $\frac{1}{80}$  ccm u. s. w.

2) + bedeutet Gerinnung, — keine Gerinnung.

3) Vielleicht sind beide Fermente identisch, ihre Funktionen nur verschiedene Eigenschaften eines Fermentes.

Merck) und als Verdauungstoff eine mit 2 Proz. Phenol gefällte, 10-fach verdünnte Pferdeblutserumlösung. Die Methode beruht auf der Verdauung des aus dem Serum ausgefällten Eiweißes durch das Pepsin in saurer Lösung. Die Versuche wurden folgendermaßen angestellt: In eine Reihe Reagenzgläser wurden je 0,1 ccm Serum und steigende Mengen von Pepsin gefüllt, dazu je  $\frac{1}{2}$  ccm  $\frac{1}{10}$  Normalsalzsäure<sup>1)</sup>. Nach 10 Minuten wurden  $2\frac{1}{2}$  ccm Pferdeblutserumlösung hinzugefügt und das Gemisch auf weitere 10 Minuten ins Wasserbad von 38° gestellt. In den dann klaren Röhrchen war Verdauung eingetreten.

## I.

			0,1 <sup>2)</sup>	0,2	0,3	0,4	0,5
a)	Kontrolle ohne Serum		trüb	trüb	trüb	klar	klar
b)	Serum Kü.	(Trypsinhemmung 0,15)	„	„	kl.	„	„
c)	„ Wer.	(„ 0,15)	„	„	tr.	„	„
d)	„ Pfl.	(„ 0,15)	„	„	tr.	„	„
e)	„ Tru.	(„ 0,3)	„	„	kl.	„	„
f)	„ Ha.	(„ 0,3)	„	„	kl.	„	„

II<sup>3)</sup>.

			0,2	0,4	0,6	0,8
d)	Serum Pfl.	(Trypsinhemmung 0,15)	trüb	trüb	klar	klar
e)	„ Tru.	(„ 0,3)	„	„	„	„
f)	„ Ha.	(„ 0,3)	„	kl.	„	„
g)	„ St.	(„ 0,15)	„	tr.	„	„
h)	„ We.	(„ 0,25)	„	„	„	„
i)	„ Ro.	(„ 0,15)	„	klar?	„	„

Es sind wohl Schwankungen in der Antipepsinwirkung vorhanden, jedoch stehen diese in keinem parallelen Verhältnis zur antitryptischen Kraft der Sera. Auch hier zeigt sich, wie beim Lab, teilweise eine geringere Hemmung der Sera, die das Trypsin stärker hemmend beeinflussen, vielleicht ein Zeichen für die nahe Verwandtschaft resp. Identität der Fermente.

1) Die Salzsäure löste schon an sich einen Teil des gefällten Eiweißes, so daß das Gemisch beim Zusatz von HCl etwas klarer wurde. Trotzdem war der Unterschied der Trübung in den von Pepsin nicht verdauten Röhrchen von den verdauten deutlich.

2) 0,1 ccm usw. der 1-proz. Pepsinlösung.

3) Diese Versuche sind nicht mit den gleichen Lösungen angestellt; daher vielleicht die Abweichungen in den beiden Werten gleicher Sera d und e.

## C. Emulsin.

Um die Beeinflussung des Emulsins zu bestimmen, wandle ich eine Methode an, die darauf beruht, daß sich bei der Einwirkung von Emulsin auf Amygdalin neben Glykose Blausäure und Benzaldehyd bilden. Ich nahm eine Emulsinlösung von 1 g Emulsin (Kahlbaum, Berlin) auf 36 g Aq. dest., die mit wenigen Tropfen Toluol vermischt war, und eine 5-proz. Amygdalinlösung. Die Fermentwirkung bestimmte ich nach 5 Minuten durch das Auftreten von Blausäure und Benzaldehyd, die durch den typischen Geruch leicht zu erkennen sind. Ich ließ die Flüssigkeit dazu von Filtrierpapier aufsaugen, um eine größere Riechoberfläche zu erhalten.

## I.

Je 0,2 ccm Amygdalinlösung.

	0,2 <sup>1)</sup>	0,1	0,05	0,025	0,0125
a) ohne Serum	+	+	+	+	—
b) 0,05 ccm Serum (Trypsinhemmung 0,1)	+	+	+	—	—
c) 0,1 " " ( " " 0,1)	+	+	+	—	—
d) 0,1 " " ( " " 0,4)	+	+	+	—	—

Es ist wieder kein Unterschied zwischen dem Trypsin stark- und schwachhemmenden Serum, wohl aber eine Hemmung des Emulsins überhaupt nachgewiesen.

## II.

Erst nachdem Ferment und Serum 10 Minuten aufeinander eingewirkt hatten, wurde Amygdalin zugesetzt.

	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125
a) Kontrolle ohne Serum	+	+	+	+	+	—
b) 0,1 ccm Serum Eb. (Trypsinhemmung 0,4)	+	+	+	—	—	—
c) 0,1 " " Vol. ( " " 0,4)	+	+	+	—	—	—
d) 0,1 " " Schw. ( " " 0,1)	+	+	+	—	—	—

Es geht aus dieser Versuchsreihe hervor:

- 1) daß die Hemmungskraft höher ist, wenn das Serum sich vor Beginn des Versuches mit dem Ferment inniger mischen kann;

1) 0,2 ccm u. s. w. der Emulsinlösung.



- 2) daß ein Unterschied in der Hemmungskraft der Sera, die das Trypsin so verschieden beeinflussen, ebenfalls nicht vorhanden ist.

#### D. Lipase.

Als Lipase benutzte ich Cobragift, dessen hämolytische Wirkung nach v. Dungern und Coca „einzig und allein auf einem lipolytischen Ferment beruht, durch dessen Funktion hämolytische Spaltungsprodukte, vor allem Desoleolecithin und Oelsäure entstehen“. Leider stieß ich bald auf große Schwierigkeiten, die aufzuklären nicht in den Rahmen meiner Untersuchungen gehört. Trotz allem aber hat sich doch gezeigt, daß eine Parallelität zwischen Lipase- und Trypsinhemmung auch hier nicht vorhanden ist. Die Versuchsanordnung war folgende: Ich bereitete mir

- 1) eine 1 ‰ Giftlösung (Cobragift, Institut Pasteur, Lille);
- 2) eine Lecithinlösung, indem ich einen Teil einer 1-proz. Lecithinmethylalkohollösung in 15 Teile Kochsalzlösung (0,8-proz.) so einblies, daß ich eine feine Emulsion erhielt;
- 3) eine 5-proz. Rinderblutlösung.

Die Reaktion geht so vor sich, daß die Cobralipase das Lecithin in freie Oelsäure und Desoleolecithin spaltet. Diese Komponenten sind hämolytisch, machen also das mit Rinderblutlösung versetzte Gemisch klar.

Je  $\frac{1}{2}$  ccm Lecithinemulsion, je 1 ccm Blutlösung, je 0,1 ccm Serum<sup>1)</sup> und verschiedene Giftmengen. + bedeutet Hämolyse, — keine Hämolyse.

#### I.

		Giftlösung ccm									
		$\frac{2}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$
a) Kontrolle ohne Serum	n. 5 Min.	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	n. $\frac{3}{4}$ Std.	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
b) Serum (Trypsinhemmung 0,15)	n. 5 Min.	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—
	n. $\frac{3}{4}$ Std.	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
c) Serum (Trypsinhemmung 0,3)	n. 5 Min.	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
	n. $\frac{3}{4}$ Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1) Serum und Ferment waren stets 10 Minuten vor Ansetzen der Reihe zusammen. Die Sera waren inaktiviert.

## II.

		Giftlösung cem										
		2/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
a) Kontrolle ohne Serum	n. 5 Min.	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
b) Nur Lecithin und Blut		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
c) Nur Gift, Serum und Blut		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d) Serum We. (Trypsinhem. 0,25)	n. 5 Min.	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e) Serum Leu. (Trypsinhem. 0,25)	n. 5 Min.	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
f) Serum Hei. (Trypsinhem. 0,15)	n. 5 Min.	+	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
g) Serum Tru. (Trypsinhem. 0,3)	n. 5 Min.	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
h) Serum Pfl. (Trypsinhem. 0,15)	n. 5 Min.	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	n. 15 Min.	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	n. 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Eine die Lipase hemmende Wirkung ist nicht überall erkennbar. Einige Sera besitzen offenbar eine die Hämolyse begünstigende Wirkung, andere zeigen gar keinen Unterschied gegen die Kontrolle ohne Serum, einzelne dagegen Hemmung, Man muß also annehmen, daß neben einer hemmenden Wirkung des Serums noch ein die Hämolyse begünstigender Faktor vorhanden sein kann. Daß es nicht Hämolsine des Blutserums sind, geht daraus hervor, daß die Sera auch nach halbstündigem Erhitzen auf 60° die begünstigende Wirkung aufwiesen. Da durch begünstigendes Serum und Cobralipase allein keine Hämolyse zustande kam, so muß es sich um eine Begünstigung der Cobralecithinhämolyse handeln. Welcher Art diese Stoffe sind, konnte ich hier nicht feststellen. Vielleicht besteht ein bestimmter Zusammenhang mit der betreffenden Erkrankung. Jedenfalls sind bei der Untersuchung zwei un- aufgeklärte Faktoren zu berücksichtigen, die eine Subtraktionswirkung zeigen, so daß ich sichere Schlüsse auf die Hemmungsfähigkeit der Sera gegen die Lipase nicht ziehen kann. Trotz-

dem scheint mir doch deutlich aus den Reihen hervorzugehen, daß eine Parallelität mit der Trypsinhemmung nicht vorhanden ist.

Ich habe also an vier Fermenten nachgewiesen, daß sie nicht in gleicher Weise durch Sera beeinflußt werden wie das Trypsin. Es ist nicht anzunehmen, daß andere Fermente, die dem Trypsin auch nicht näher stehen, sich anders verhalten sollten, so daß ich, ohne weitere Fermente zu untersuchen, eine allgemeine Antifermenterhöhung ausschließen und die Spezifität der Hemmung tryptischer Fermente als sicher bewiesen ansehen kann. Damit wird die Annahme einer allgemeinen Blutveränderung hinfällig. Es handelt sich nicht um Auftreten von Stoffen im Blut, die, wie z. B. das Cholesterin, eine Hemmung aller Fermente zeigen. Auch der vermehrte Gehalt an gelöstem Eiweiß kann nicht die Ursache sein, da sonst wenigstens das Pepsin in gleicher Weise wie das Trypsin gehemmt werden müßte. Ob nun aber die spezifische Antitrypsinvermehrung auf Bildung wirklicher Antikörper zurückzuführen ist, oder ob eine andere spezifische Veränderung des Blutes die Ursache ist, ist noch unaufgeklärt. Es bleibt dies noch weiteren Forschungen überlassen.

#### Zusammenfassung.

Kurz zusammengefaßt, ergeben also meine Untersuchungen, daß wohl die Briegersche Behauptung einer Antitrypsinerhöhung bei Krebskranken zu Recht besteht, daß diese aber nichts mit der Krebskrankheit als solcher zu tun hat, also nicht für diese spezifisch ist, sondern überall dort auftritt, wo entweder Körpergewebseinschmelzung, wahrscheinlich unter dem Einfluß der neutrophilen gelapptkernigen Leukocyten, oder überhaupt Leukocytose und damit vermehrter Untergang solcher Leukocyten zugleich mit Freiwerden vermehrter Mengen tryptischen Fermentes stattfindet. Ob das Auftreten der Antitrypsinerhöhung auf Anwesenheit wirklicher Antikörper beruht, also ein natürlicher Immunisationsvorgang ist, ist nicht sicher nachgewiesen. Der Gedanke liegt sehr nahe. Jedenfalls handelt es sich nicht um eine allgemeine Antifermentreaktion, da eine Parallelität der Hemmungskraft gegen

andere Fermente sich nicht gezeigt hat, sondern um eine spezifische antitryptische Wirkung.

Zum Schluß will ich es nicht unterlassen, Herrn Prof. Dr. Freiherrn von Dungern und Herrn Prof. Dr. Leonor Michaelis für die unterstützenden Ratschläge und Anregungen bei Abfassung der Arbeit, die in ihren Laboratorien (1. wissenschaftliche Abteilung des Krebsinstitutes Heidelberg und biologische Abteilung des Berliner städtischen Krankenhauses am Urban) ausgeführt wurde, meinen ergebenen Dank auszusprechen.

#### Literaturverzeichnis.

- 1) Achalme, Annales de l'Institut Pasteur, 1901.
- 2) — Société de Biologie, 1899, Bd. 51.
- 3) Ascoli und Bezzola, Berl. klin. Wochenschr., 1903, No. 17.
- 4) Aronsohn und Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medizin, 1908.
- 5) Bergmann und Bamberg, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 29.
- 6) — und Meyer, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 37.
- 7) Bergel, Münch. med. Wochenschr., 1909.
- 8) Bittorf, Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. 91.
- 9) Brieger und Trebing, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 22.
- 10) — — Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 29.
- 11) — — Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 51.
- 12) Briot, Thèse de Paris, 1900.
- 13) Camus und Gley, Société de Biologie, 1897.
- 14) Charin und Levaditi, Société de Biologie, 1900, Bd. 52.
- 15) Delezenne, Société de Biologie, 1901.
- 16) — Société de Biologie, 1902.
- 17) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr., 1898.
- 18) — und Coca, Biochem. Zeitschr., Bd. 12, 1908.
- 19) Eppenstein, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 45.
- 20) — Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. 94.
- 21) Erben, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 52.
- 22) — Centralbl. f. innere Medizin, 1907, No. 3.
- 23) Fermi, Arch. f. Hygiene, Bd. 10, 1890.
- 24) — Arch. f. Hygiene, Bd. 55.
- 25) — und Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 18, 1899.
- 26) Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 31, 1901.
- 27) Fürst, Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 2.
- 28) Glässner, Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 4.
- 29) Gross, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmacol., 1907, No. 58.
- 30) Hahn, Berl. klin. Wochenschr., 1897.
- 31) Hammarsten, Malys Jahresbericht, 1887.

- 32) Herzfeld, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 49.
- 33) Hildebrandt, Virch. Arch., Bd. 131, 1893.
- 34) Jochmann und Müller, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 41.
- 35) — und Kantorowicz, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 66, 1908.
- 36) — — Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 14.
- 37) — und Lockemann, Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. 11, 1908.
- 38) — und Ziegler, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 43.
- 39) Kolaczek und Müller, Deutsche med. Wochenschr., 1907.
- 40) Klieneberger und Scholz, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 93.
- 41) Korschun, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 36, 1902.
- 42) Landsteiner, Centralbl. f. Bakteriöl., Bd. 27, 1900.
- 43) Markus, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 14.
- 44) Mathes, Centralbl. f. med. Wissensch., 1894.
- 45) Morgenroth, Centralbl. f. Bakteriöl., Bd. 26, 1899.
- 46) — Centralbl. f. Bakteriöl., Bd. 27, 1900.
- 47) Müller, Fr., Kongreß f. innere Med., 1902.
- 48) — Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 91, 1907.
- 49) — Centralbl. f. innere Med., 1907.
- 50) — Allgem. med. Centralztg., 1907, No. 26.
- 51) — Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 92, 1908.
- 52) — und Jochmann, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 29.
- 53) — — Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 31.
- 54) — — Kongreß f. innere Med., 1907.
- 55) — und Kolaczek, Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 8.
- 56) — und Peiser, Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 17.
- 57) Michaelis, L., Biochem. Zeitschr., Bd. 10, 1908.
- 58) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen.
- 59) Opie und Barker, Journ. of experim. Med., 1907.
- 60) Pappenheim, Virch. Arch., Bd. 157.
- 61) Pfleiderer und Lörker, Pflügers Arch., Bd. 49 und 66.
- 62) Pugliese und Coggi, Bullettino Scienze med., 1897.
- 63) Rödén, refer. von Hammarsten, Malys Jahresber., 1887.
- 64) Schulz und Chiarolanza, Deutsche medicin. Wochenschr., 1908, No. 30.
- 65) Stern und Eppenstein, Allgem. med. Centralztg., 1906, No. 29.
- 66) Wiens, Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 91, 1907.
- 67) — Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 53.
- 68) — Centralbl. f. innere Med., Bd. 31, 1908.
- 69) — und Müller, Centralbl. f. innere Med., 1907, No. 38.

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institute (Vorstand: Hofrat Professor Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ (Vorstand: Dr. E. Freund) in Wien.]

### **Chemische und experimentelle Beiträge zum Studium der Anaphylaxie.**

Von Privatdozent Dr. **E. P. Pick** und Dr. **T. Yamanouchi** (Tokio).

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Februar 1909.)

Durch die interessanten Untersuchungen Richets über die Einwirkung gewisser eiweißartigen, aus Actinien und Miesmuscheln gewonnenen giftigen Produkte wurde eine experimentelle Grundlage geschaffen für das Studium des bereits früher bei der Immunisierung mit Bakteriengiften gelegentlich beobachteten Zustandes der Ueberempfindlichkeit. Derselbe besteht darin, daß der Organismus bei der Vorbehandlung mit einem bestimmten, ihm artfremden Körper von Antigencharakter an Stelle der sonst sich allmählich entwickelnden Unempfindlichkeit eine Ueberempfindlichkeit gegen den neuerdings eingeführten Körper erwirbt, so daß an sich völlig ungiftige Dosen bei einer nach einem bestimmten Zeitintervalle wiederholten Applikation binnen wenigen Minuten ein schweres, charakteristisches Krankheitsbild oder den Tod des Versuchstieres erzeugen können. Dieser von Richet als Anaphylaxie bezeichnete Zustand der Ueberempfindlichkeit hat vor allem durch die bedeutungsvollen Studien v. Pirquets und Schicks nicht allein eine klinische Wichtigkeit erlangt, sondern auch unter dem Namen der allergischen Reaktion als ein differentialdiagnostisches Prinzip für die Erkenntnis gewisser Infektionskrankheiten eine hervorragende Rolle erworben.

Ein besonderes Interesse gewinnt die Erscheinung der Anaphylaxie dadurch, daß 1) nicht nur giftige Substanzen, sondern, wie Theobald Smith und später auch Rosenau und Anderson u. a. zeigten, im allgemeinen jedes artfremde Eiweiß, wie Pferdeserum, Eiereiweiß, Milch, Hämoglobin, sowie

auch Pflanzeneiweißkörper Anaphylaxie erzeugen können, daß 2) die Auslösung des Zustandes am leichtesten durch den zur Vorbehandlung benützten Eiweißkörper gelingt, so daß der Auslösungsvorgang ein relativ spezifischer ist (Gay und Southard), und daß 3) der anaphylaktische Zustand von einem überempfindlichen Tier auf ein normales mittels des Blutes oder Serums übertragen werden kann, wie dies aus den Untersuchungen von Gay und Southard, Otto, Friedemann, Richet, Kraus und Doerr hervorgeht (passive Anaphylaxie).

Aus den bisher vorliegenden Tatsachen würde sich ferner ergeben, daß an der Erzeugung des anaphylaktischen Vergiftungsbildes mehrere Substanzen beteiligt sind, die sich voneinander durch ihre verschiedene Resistenz beim Erhitzen, ferner durch ihre Alkoholfällbarkeit und Aussalzbarkeit scheinbar unterscheiden lassen. So nimmt Besredka im Pferdeserum eine hitzebeständige Substanz an, welche ohne Schaden Temperaturen von 100—120° verträgt und, normalen Tieren beigebracht, diese nach einiger Zeit in den Zustand der Ueberempfindlichkeit zu versetzen vermag (Sensibilisinogen nach Besredka, Anaphylaktin nach Gay und Southard, Toxogenin nach Richet). Im Gegensatz dazu soll jener Serumbestandteil, welcher bei den überempfindlichen oder sensibilisierten Tieren die Vergiftung auslöst, also toxisch wirkt, durch Erhitzen auf 56—100° abgeschwächt und zerstört werden (Antisensibilisin nach Besredka, Congestin nach Richet). Auch Vaughan und Wheeler haben eine Trennung des sensibilisierenden und des toxischen Prinzipes beim Eiereiweiß durchzuführen versucht, indem es ihnen gelang, durch Auskochen mit alkalischem Alkohol die toxische Substanz in Lösung zu bringen, während die gegen Eiereiweiß intensiv sensibilisierende in Alkohol unlöslich blieb.

Endlich haben Gay und Adler unter Zuhilfenahme der fraktionierten Fällung des Pferdeserums mit Ammonsulfat den Versuch gemacht, die beiden Substanzen voneinander zu scheiden, und fanden, daß die Vorbehandlung der Tiere besonders gut und in kurzer Zeit bei Verwendung von Euglobulinlösungen gelänge, dagegen die Auslösung der anaphylaktischen

Symptome bei mit Pferdeserum vorbehandelten Tieren nicht mit Euglobulin, sondern nur mit Albuminlösungen möglich sei; es würde danach das Sensibilisinogen hauptsächlich im Euglobulin, das Antisensibilisin im Albumin enthalten sein. Gleichzeitig und unabhängig von den eben genannten Autoren machten Doerr und Raubitschek die Beobachtung, daß sowohl ein mit Kohlensäure aus Pferdeserum ausgefälltes Globulin als auch das Filtrat desselben anaphylaktisierende Körper enthielten, daß aber bei der Vorbehandlung mit Kohlensäureglobulin der anaphylaktische Zustand später eintrat, als bei Vorbehandlung mit dem Globulinfiltrat.

So wertvoll in mancher Richtung diese angeführten Tatsachen auch sind, lassen sie über die Natur der reagierenden Körper kein Urteil zu, ja nicht einmal darüber, ob in der Tat zur Vor- und Nachbehandlung verschiedene Körper nötig sind, da die genaue Durchsicht der einschlägigen Literatur zuweilen eine große Verschiedenheit der Versuchsergebnisse selbst bei Benützung einer und derselben Substanz aufweist, wobei nicht nur die Natur der verwendeten Substanz, sondern auch die Beschaffenheit des Versuchstieres, die Art der Applikation, die Menge der injizierten Substanz und die davon abhängige Dauer des präanaphylaktischen Stadiums eine große Rolle spielen.

Neben den eben angeführten, zumeist mit Bestandteilen des nativen Pferdeserums ausgeführten Versuchen wäre noch auf einige Angaben hinzuweisen, welche indes ebenfalls die anaphylaktisierende Substanz in chemischer Hinsicht kaum näher zu charakterisieren geeignet sind, wie z. B. die aus Bakterien oder aus Organen hergestellten anaphylaktisierenden eiweißhaltigen Filtrate (Rosenau und Anderson, Doerr und Kraus, Doerr, Kraus und Sohma).

Von größerem Interesse für die Beurteilung der chemischen Natur der die Anaphylaxie erzeugenden Körper erscheinen uns allenfalls noch nachfolgende Tatsachen. So stellte Richet seine Congestine, das Actino- und Mytilocongestin in der Weise dar, daß er wässrige Extrakte aus den zerkleinerten Tentakeln der Actinien oder aus Muscheln unter Zusatz von Fluornatrium erzeugte und diese mit dem 3-fachen Volumen 95-proz. Alkohols fällte. Die erhaltenen, durch wiederholtes Lösen in



Wasser und Fällern mit Alkohol gereinigten eiweißhaltigen Niederschläge stellten die betreffenden Gifte dar, mit denen Richet experimentierte. Das auf diesem Wege erhaltene Mytilocongestin ist nach Richet unlöslich in Alkohol, löslich in Wasser, enthält hitzeagulables Eiweiß und fällt mit Salpetersäure; beim Aufkochen der Lösung wird es zerstört. Richet hält das Gift, wohl nicht im Einklange mit dessen eben genannten Eigenschaften, für eine Albumose. Wie bereits früher erwähnt, fand Besredka, daß Pferdeserum durch 15 Minuten auf 100—120° erhitzt werden kann, ohne seine anaphylaktisierenden Eigenschaften zu verlieren; dasselbe gilt auch von gekochter Milch. Rosenau und Anderson, welche mit Diphtheriepferdeserum vorbehandelte Meerschweinchen zu ihren Versuchen benützten, fanden bei Zusatz von verschiedenen Fermenten zu dem für die Nachbehandlung bestimmten Pferdeserum, wie Takadiastase, Pancreatin, Myrosin, Invertin, Emulsin, Pepsin in saurer und alkalischer (?) Lösung, Papain und vielen anderen Produkten, wie verdünnter Butter- und Bernsteinsäure, 1-proz. Permanganatlösung, Alkaloiden und Salzen, keine Beeinflussung der anaphylaktischen Erscheinungen. Indes kann diesen Versuchen für die Beurteilung der Wirkungsweise der Fermente auf das Serum keinerlei Beweiskraft zukommen, da sich die genannten Autoren einfach damit begnügten, die Pferdeserum-Fermentgemenge zu injizieren, ohne die für die Möglichkeit der Entfaltung einer Fermentwirkung notwendigen Bedingungen zu erfüllen oder sich von irgendeiner Fermentwirkung zu überzeugen. Ebenso wenig lassen sich für eine chemische Charakterisierung die übrigens auch nicht experimentell einwandfreien Versuche von Rosenau und Anderson über die Erzeugung der Anaphylaxie durch ein nicht näher bezeichnetes Peptonpräparat verwerten, dem die Autoren — sie benützten eine halb oder ganz gesättigte Peptonlösung — leichte sensibilisierende und toxische Eigenschaften zuschreiben; dasselbe gilt auch von den mit wässerigen Tyrosin- und Leucinlösungen angestellten negativen Versuchen. Bemerkenswerter erscheinen dagegen die Versuche derselben Autoren, in denen es scheinbar gelang, durch länger fortgesetzte Verfütterung von frischem und getrocknetem Pferdeserum, Pferdefleisch und Rindfleisch Meer-

schweinchen derart zu sensibilisieren, daß eine am Ende der Fütterungsperiode ausgeführte intraperitoneale Injektion von Pferdeserum anaphylaktische Symptome herbeiführte. Es würde dieser Versuch lehren, daß bei reichlicher Zufuhr von fremdartigem Eiweiß ein Teil desselben in die Blutbahn gelangen und als Sensibilisinogen wirken kann, ähnlich wie wir dies bereits aus den Präzipitinstudien kennen (Ascoli, Uhlenhuth).

Schließlich sei noch hervorgehoben, daß Gay und Adler den aus Pferdeserum gewonnenen Aetherextrakt sowohl auf dessen sensibilisierende als auch auf dessen toxische (Anaphylaxie auslösende) Wirkung prüften und feststellen konnten, daß dem wiederholt gereinigten Aetherextrakt keine von beiden Wirkungen zukommt.

Die Ziele, welche die nachfolgenden Untersuchungen verfolgten, waren: teils auf chemischem, teils auf experimentellem Wege, einiges über die chemische Natur der reagierenden Körper festzustellen und dadurch auch einigen Einblick in den Zusammenhang der anaphylaktischen Reaktion mit den besser bekannten Immunphänomenen zu gewinnen. Es lag uns die Frage am nächsten, ob in derselben Weise, wie bei den Präzipitations- und Agglutinationsvorgängen, die von Obermayer und dem einen von uns studierte Beeinflussung der Spezifität durch physikalische und chemische Agentien auch bei der Auslösung der Anaphylaxie möglich sei, da durch die speziell bei den Präzipitationsphänomenen gelungene künstliche Aenderung der Spezifität (Zustands- und Artspezifität) je nach dem vorgenommenen physikalischen und chemischen Eingriff ein sicherer Beweis für die Eiweißnatur der betreffenden Antigene erbracht und ein wahrscheinlicher Zusammenhang der Artspezifität mit dem aromatischen Kern des Eiweißes festgestellt werden konnte.

Wir haben dementsprechend Tiere mit verschiedenen Eiweißprodukten vorbehandelt und ebenso zur Nachbehandlung desselben Tieres uns verschiedener Eiweißderivate bedient. Bereits vor mehr als zwei Jahren hat einer von uns in Gemeinschaft mit R. Kraus einschlägige Versuche mit gekochtem und jodiertem Eiweiß an Meerschweinchen angestellt, Versuche,

die damals aus äußeren Gründen keine Fortsetzung erfuhren. Wir suchten jetzt die Frage zu entscheiden, ob mit anderem als nativem Eiweiß sich Tiere sensibilisieren lassen, und ebenso, ob zur Nachbehandlung der sensibilisierten Tiere nur natives Eiweiß oder auch dessen Spaltungsprodukte verwertet werden können. Gerade die letztere Frage war für uns von besonderem Interesse, weil aus den bisherigen Angaben der Autoren hervorzugehen scheint, daß die zur Nachbehandlung notwendige toxische Substanz labiler Natur ist; so verwendeten wir neben nativem Rinder- und Pferdeserum Pepsin- und Trypsin-Verdauungsprodukte dieser beiden Sera, gekochtes Rinderserum, das aus Rinderfibrin dargestellte Wittepepton, ferner jodierte und nitrierte Spaltungsprodukte der erstgenannten Sera und endlich die durch Alkoholextraktion gewonnenen alkohol-löslichen Serumbestandteile, welche wir unter dem Namen Serumlipoide zusammenfassen. Schließlich untersuchten wir, ob arteigenes Serumeiweiß, das an sich weder eine sensibilisierende, noch eine giftige Wirkung auf sensibilisierte Tiere ausübt, diese Eigenschaften erlangen kann, wenn es artgleichen Tieren entnommen ist, welche einen Immunisierungsprozeß durchgemacht haben. Es sollte auf diese Weise festgestellt werden, ob der Einfluß eines derartig nur in einer Richtung veränderten Serums der gleiche auf die Körperzellen ist, wie der eines körperfremden Serums.

Als Versuchstiere benützten wir ausschließlich Kaninchen von 500—700 g Gewicht, da schwerere Kaninchen häufig eine geringere Empfindlichkeit zeigen. Zur Reaktion bedienten wir uns sowohl des Verfahrens der aktiven als auch der passiven Anaphylaxie, welche letztere neben ihrer großen Empfindlichkeit den Vorteil besitzt, daß das Blut eines einzigen vorbehandelten Tieres auf eine größere Anzahl von Testtieren übertragen werden kann. Die Uebertragung erfolgte dabei stets mittels intraperitonealer Injektion von defibriniertem Blut oder Serum, die Nachbehandlung stets mit Hilfe der intravenösen Injektion der zu prüfenden Substanzen.

Als positive anaphylaktische Symptome bezeichneten wir kurz nach der intravenösen Injektion oder im Verlauf von 1—2 Stunden auftretende schwere Dyspnoë mit Paresen aller Extremitäten, allgemeiner Muskelschlaffheit, Stuhl- und Harn-

abgang, Krämpfen, eventuell Tod, falls derselbe im Anschluß an die genannten Symptome auftrat. In allen Versuchen dienten normale Kaninchen als Kontrolltiere zum Vergleiche der Wirkung der intravenös verabfolgten Präparate.

#### **A. Die Einwirkung der Pepsinsalzsäureverdauung.**

Wir bedienten uns zu unseren Versuchen zunächst des Pepsinfermentes aus dem Grunde, weil, soweit die bisherigen Erfahrungen reichen, die Pepsinsalzsäureverdauung nahezu alle Antigene in kurzer Zeit vernichtet. So ist es durch die Untersuchungen von Obermayer und Pick bekannt, daß die Pepsinsalzsäureverdauung bereits nach wenigen Minuten das Präzipitinogen vollständig zerstört; es war demnach für uns die Möglichkeit gegeben, die Frage über den Zusammenhang zwischen dem Sensibilisinogen und dem Präzipitinogen auf diesem Wege exakt zu entscheiden. Zu diesem Zwecke wurden 25 ccm Rinderserum mit 1 ccm 20-proz. Salzsäure und 0,5 g Pepsin Fairchild versetzt und 15 Minuten lang bei 38° C verdaut; hierauf wurde diese Lösung mit Soda neutralisiert; sie enthielt noch koagulables Eiweiß und reichliche Mengen von Albumosen, dagegen war mit Hilfe eines äußerst empfindlichen präzipitierenden Rinder-Kaninchen-Immunserums keine Präzipitation nachweisbar. Es war demnach durch die Pepsinsalzsäureverdauung das gesamte Rinderserumpräzipitinogen zerstört worden. Diese Lösung wurde subkutan zu 2 ccm nachfolgenden Kaninchen injiziert (siehe Tabelle I).

Man ersieht bei Ueberblick der nachstehenden Versuche, daß die kurzdauernde Pepsin-HCl-Verdauung des Rinderserums, welche das Serumpräzipitin und das Präzipitinogen zerstört, die Lösung durchaus nicht der Fähigkeit beraubt, Kaninchen sowohl zu sensibilisieren als auch die anaphylaktischen Symptome prompt auszulösen. Es ist sogar bereits nach 6 Tagen, also nach relativ kurzer Zeit, gelungen, bei den mit den Pepsin-HCl-Verdauungsprodukten vorbehandelten Tieren die Anaphylaxie mit denselben Produkten auszulösen; aber auch mit nativem Rinderserum konnten schon nach 9 Tagen die schwersten anaphylaktischen Erscheinungen, ja sogar der anaphylaktische Tod hervorgerufen werden bei Tieren, welche mit derartigen

Tabelle I.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Subkutane Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
1	1	2 ccm $\frac{1}{4}$ -stünd. Pepsin-HCl-Verdauung, Lösung des Rinderserums	6 Tagen	4 ccm $\frac{1}{4}$ -stünd. Pepsin-HCl-Verdauung des Rinderserums	keine Symptome
2	2	dgl.	6 „	7 ccm derselben Lösung	unmittelbar nach der Injektion schwere dyspnoische Anfälle, Jaktationen, Tier fällt auf die Seite, zeigt Lähmungserscheinungen; nach einiger Zeit wieder völlig erholt
3	3	„	5 „	5 ccm normales Rinderserum	keine Symptome
4	4	„	6 „	5 ccm normales Rinderserum	„ „
5	5	„	9 „	5 ccm normales Rinderserum	unmittelbar nach der Injektion schwerste Dyspnoë; Tier fällt auf die Seite und bleibt ca. $\frac{1}{2}$ Stunde unter schwerer Dyspnoë und Parese aller Extremitäten liegen, später erholt sich das Tier völlig
6	6	„	9 „	5 ccm normales Rinderserum	10' nach der Injektion Beginn der schweren Dyspnoë, welche sich steigert, Parese, Krämpfe, Tod.

Verdauungsgemischen vorbehandelt worden waren. Das rasche Auftreten der Anaphylaxie bei der Verwendung obiger Pepsin-Verdauungsprodukte erinnert an die Beobachtungen von Gay und Adler, welche bei der Verwendung von Euglobulin als Sensibilisinogen bereits nach 4 und 5 Tagen bei Meerschweinchen Anaphylaxie zu erzeugen vermochten.

Diese Versuche lehren zunächst, daß zwischen der spezifischen Präzipitinreaktion, resp. dem Präzipitinogen der Eiweißkörper und den die Anaphylaxie anregenden und auslösenden Körpern ein direkter Zusammenhang nicht besteht und daß

beide Körper mit Hilfe der Pepsinverdauung voneinander getrennt werden können. Rosenau und Anderson, welche sich vornehmlich mit der Frage beschäftigten, ob die toxische Wirkung des Pferdeserums auf anaphylaktische Tiere mit der präzipitierenden Komponente zusammenhängt, fanden, daß ein Pferdeserum, welches mit einem spezifisch präzipitierenden Meerschweinchenserum ausgefällt worden war, bei entsprechend sensibilisierten Meerschweinchen Anaphylaxie und Tod herbeizuführen vermag. Wenn auch einem derartigen Präzipitationsversuch, bei welchem nicht das Pferdeserum, sondern das präzipitierende Meerschweinchenserum das wesentliche Substrat der Reaktion bildet, keine entscheidende Rolle zufällt, zumal eine vollständige, an sich schwierige Absättigung des Pferdeserums nicht versucht worden war, so sprechen auch anderweitige Versuche von v. Pirquet und Schick, wie auch von Rosenau und Anderson, in denen gezeigt wurde, daß die anaphylaktische Reaktion viel früher eintrat als die Präzipitinbildung, dafür, daß im Organismus beide Prozesse scheinbar unabhängig voneinander verlaufen. Unsere Versuche zeigen, daß auch in den Eiweißkörpern beide Fähigkeiten, die präzipitinogene und die sensibilisierende resp. toxische, verschiedenen Komplexen zugehören dürften, falls die Annahme nicht zu Recht besteht, daß die differente Wirkung nur der Ausdruck der verschiedenen Reaktionsfähigkeit und Empfindlichkeit des Organismus gegenüber der sensibilisierenden (toxischen) und präzipitinogenen Wirkung eines und desselben Komplexes ist.

Es ergibt sich aus der oben angeführten Versuchsreihe weiter die bemerkenswerte Tatsache, daß trotz Vorbehandlung der Tiere mit Verdauungsprodukten dennoch mit nativem, unverändertem Serum Anaphylaxie ausgelöst werden kann, ein Verhalten, welches in späteren Versuchen bei Anwendung verschiedenartiger Spaltungsprodukte noch prägnanter wiederkehrt und darauf hinweist, daß die Zustandsspezifität, wie wir sie bei der Präzipitinreaktion durch die Untersuchungen von Obermayer und Pick, dann Michaelis und Fleischmann kennen gelernt haben, hier nicht zu Recht besteht.

In den vorher angeführten Versuchen wurde die Vorbehandlung der Tiere mit Pepsinverdauungsgemischen durch-

geführt, in denen noch koagulables, allerdings präzipitinogen-freies Eiweiß nachzuweisen war; da bei den äußerst geringen Eiweißmengen, welche zur Sensibilisierung der Versuchstiere ausreichen, die Möglichkeit nicht auszuschließen war, daß irgendwelche durch die Pepsin-HCl-Verdauung unverändert gebliebenen Eiweißreste die Ursache der Sensibilisierung abgaben, wurden Versuche mit Spaltungsprodukten durchgeführt, welche einer weiter fortgeschrittenen Pepsin-HCl-Spaltung unterworfen waren, in denen kein koagulierbares oder unverändertes Eiweiß mehr vorhanden war. Als ein derartiges Produkt wurde eine 10-proz., aus Rinderfibrin hergestellte Wittepeptonlösung verwendet, welche überdies vor Gebrauch stets über freier Flamme aufgekocht worden war.

Tabelle II.

Versuchs- No. Kaninchen No.	Subkutane Vor- behandlung mit	Intravenöse Nach- behandlung		Versuchsergebnis
		nach	mit	
7	2 ccm natives Rinderserum	20 Tagen	4 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung	einige Minuten nach der Injektion schwere Dyspnoë, Lähmung der Extremitäten und Tod unter Krämpfen

In einem zweiten Versuche, in welchem die Vor- und Nachbehandlung mit Wittepepton stattfand, wurde die passive Uebertragung des gebildeten Reaktionskörpers auf normale Tiere zur Reaktion herangezogen. Zu diesem Zwecke wurde ein ca. 1800 g schweres Kaninchen (Kaninchen No. 140) mit 2 ccm 10-proz., gekochter Wittepeptonlösung intraperitoneal vorbehandelt und nach 20 Tagen aus der Arter. femoralis entblutet; das so gewonnene defibrinierte Blut wurde sofort auf 3 Kaninchen (Kaninchen No. 91, No. 32 und No. 10) im Gewichte von 300—400 g übertragen und diesen Tieren 24 Stunden später intravenös 10-proz. Wittepeptonlösung und Rinderserum beigebracht. Der Versuch ist in der nachfolgenden Tabelle übersichtlich zusammengestellt:

Tabelle III.

Versuchs- No.	Vorbehandlung mit dem defibrinierten Blute des Kaninchens No. 140	Intravenöse Nachbehandlung nach 24 Stunden mit	V Versuchsergebnis
8	Kaninchen No. 91 er- hält 5 ccm Blutes in- travenös	6 ccm gekochter 10-proz. Wittepeptonlösung	Tier nach der Injektion schwer dyspnoisch, Parese und Tod nach ca. $\frac{1}{4}$ Stunde
9	Kaninchen No. 32 er- hält 5 ccm Blutes in- traperitoneal	6 ccm gekochter 10-proz. Wittepeptonlösung	schwere anaphylakti- sche Symptome (Dys- pnoë, Lähmung), nach $\frac{1}{3}$ Stunde erholt
10	Kaninchen No. 10 er- hält 5 ccm Blutes in- traperitoneal	4 ccm natives Rinder- serum	keine Erscheinungen

## Kontrollen:

Normales Kaninchen No. 8 (350 g) erhält 5 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung intravenös: keine sichtbaren Erscheinungen.

Normales Kaninchen No. 9 (390 g) erhält 6 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung intravenös: keine sichtbaren Erscheinungen.

Diese Versuche zeigen, daß bei Tieren, welche mit nativem Rinderserum sensibilisiert worden waren, gekochtes Wittepepton spezifische anaphylaktische Symptome hervorzurufen vermag; ebenso gelang die passive Uebertragung des Blutes des mit Wittepepton vorbehandelten Kaninchens auf normale Tiere, bei welchen durch eine nachträgliche Wittepeptoninjektion typische Erscheinungen der Anaphylaxie hervorgerufen werden konnten. Zahlreiche Kontrollen, von denen zwei hier angeführt werden, haben ergeben, daß die intravenöse Injektion von Wittepepton allein in den verwendeten Mengen weder bei normalen Kaninchen noch bei Tieren, die intraperitoneal mit normalem Kaninchenblut vorbehandelt waren, irgendwelche den anaphylaktischen Symptomen ähnliche Erscheinungen zu erzeugen vermag. Gelingt es ja gerade bei Kaninchen nur sehr schwer, das hier eventuell in Frage kommende Vergiftungsbild der Peptonvergiftung herbeizuführen, und selbst eine in einer wahrnehmbaren Verzögerung der Blutgerinnung sich äußernde Einwirkung des Wittepeptons auf Blut bedarf nach Gley und Pesaro einer größeren Dosis als 1 g pro Kilogramm Tier. Es geht aus den mit Wittepepton ausgeführten Versuchen die Tatsache hervor, daß der zur Auslösung der



toxischen Symptome befähigte Körper jedenfalls eine eingreifende peptische Verdauung und Erhitzen auf  $100^{\circ}$  verträgt und daß hier, worauf bereits die früher angeführten Versuche hingewiesen haben, keine Zustandsspezifität in dem bei den Präzipitinen bekannten Umfange besteht, da wir bei einem mittels Rinderserums sensibilisierten Tiere durch Wittepepton die bedrohlichsten anaphylaktischen Symptome, ja selbst anaphylaktischen Tod erzeugen können. Beide Tatsachen, einmal die hohe Widerstandsfähigkeit gegen Verdauung und Erhitzen, andererseits die Möglichkeit, toxische Symptome mit einer Substanz auszulösen, die scheinbar verschieden ist von der zur Sensibilisierung verwendeten, drängen zu einem Vergleiche mit anderen bereits bekannten Eigenschaften anaphylaktisierender Stoffe. Wie schon in der Einleitung erwähnt worden ist, hatte zuerst Besredka gefunden, daß im Pferdeserum die sensibilisierende Substanz hitzebeständig, die toxische dagegen insofern thermolabil sei, als sie bei Temperaturen über  $56^{\circ}$  allmählich abgeschwächt oder zerstört wird; auch Gay und Adler zeigen in ihren Versuchen, daß bei Erhitzen des Pferdeserums durch 15 Minuten auf  $90^{\circ}$  die toxische Substanz noch immer bei sensibilisierten Meerschweinchen schwere anaphylaktische Symptome erzeugt, daß jedoch Erhitzen durch 15 Minuten auf  $100^{\circ}$  die toxische Substanz völlig zerstört, während die sensibilisierende in Uebereinstimmung mit Besredka erhalten bleibt. Unsere Versuche mit gekochtem Wittepepton zeigen eine hitzebeständige toxische Substanz, welche nicht allein auf das Sensibilisinogen des Wittepeptons, sondern auch auf jenes des Rinderserums derart eingestellt ist, daß sie bei den auf beiderlei Weise sensibilisierten Tieren Anaphylaxie auslösen kann. Es liegt also die Möglichkeit vor, daß es verschiedene toxisch-anaphylaktische Körper gibt, neben weniger gegen Hitze widerstandsfähigen auch hitzebeständige, ein Umstand, der wahrscheinlich von der chemischen und physikalischen Beschaffenheit des betreffenden, die wirksame Substanz darstellenden oder sie begleitenden Eiweißkolloids abhängig sein dürfte. Ueber die Identität des Sensibilisinogens und der toxischen Substanz geben indes die vorliegenden Versuche

wohl keinerlei sicheren Aufschluß, wenn es auch gelungen ist, mit nativem Rinderserum Tiere zu sensibilisieren und bei diesen Tieren durch Wittepepton das anaphylaktische Vergiftungsbild auszulösen; doch deutet der Umstand, daß die bei der spezifischen Eiweißpräzipitation so scharf ausgeprägte Zustandsspezifität hier wegfällt, dahin, daß die Auslösung der Giftwirkung nicht allein mit dem gleichen zur Vorbehandlung verwendeten und in derselben physikalisch-chemischen Zustandsphase befindlichen Körper gelingt, sondern auch mit einem physikalisch und chemisch ganz anders gearteten Eiweißkörper ausgelöst werden kann, der nur das mit dem zur Vorbehandlung benützten gemein hat, daß er die gleiche Art-spezifität (originäre Spezifität) mit demselben besitzt.

Zu den vorstehenden Versuchen mag noch bemerkt werden, daß wir bei unseren zahlreichen Versuchen öfters Tiere beobachteten, die sich völlig refraktär verhielten, bei denen also trotz gleicher Vorbehandlung mit Wittepepton oder Rinder-serum keine Anaphylaxie durch nachträgliche Wittepepton-oder Seruminjektion auszulösen war. So war es uns in keinem Versuche möglich gewesen, bei einem mit Wittepepton vor-behandelten Tier durch nachträgliche Behandlung mit Rinder-serum Anaphylaxie auszulösen. Ja selbst dort, wo, wie in den Versuchen der Tabelle III, der Nachweis eines unter dem Einflusse des Wittepeptons gebildeten Reaktionskörpers durch nachträgliche Injektion von Wittepepton gelungen ist, konnte durch Seruminjektion kein positives Resultat erzielt werden. Wir halten uns jedoch nicht berechtigt, aus dem negativen Ausfall derartiger Versuche irgendwelche weiteren Schlüsse zu ziehen.

#### **B. Einwirkung der Trypsinverdauung.**

Wie in den früheren Versuchen wurde auch hier Rinder-serumeiweiß verwendet. 50 ccm Rinderserum wurden koaguliert, das erhaltene Koagulum abfiltriert, abgepreßt, in 150 ccm 0,4-proz. Soda aufgeschwemmt und mit 1 g Trypsin Rhenania 4 Tage lang im Brutschrank bei 37° verdaut; nach dieser Zeit wurde das Verdauungsgemisch neutralisiert und auf dem Wasserbade behufs Abtötung des Trypsins erhitzt. Die Flüssigkeit enthielt kein koagulables Eiweiß mehr, gab mit Ammoniumsulfat auch bei voller Sättigung keine Fällung, dagegen war mit Essigsäure-Ferrocyankalium eine leichte Trübung.

mit Phosphorwolframsäure-Salzsäure eine reichliche Fällung zu erzielen; die Lösung gab ferner eine schön rote Biuretreaktion und enthielt reichlich auskristallisiertes Tyrosin. Mit diesem relativ weit aufgespaltenen Präparate wurden Kaninchen vorbehandelt, als auch anderweitig vorbehandelte Kaninchen behufs Auslösung der anaphylaktischen Symptome intravenös injiziert; auch wurde in mehreren Fällen die passive Uebertragung des eventuell gebildeten Reaktionskörpers versucht. Die folgende Tabelle zeigt die Uebersicht einiger einschlägigen Versuche:

Tabelle IV.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Subkutane Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
11	102	2 ccm Trypsinverdauungslösung	15 Tagen	5 ccm Trypsinverdauungslösung; hierauf nach 2 Stunden 5 ccm natives Rinderserum	keine Erscheinungen; nach ca. 5 Minuten wird das Tier unruhig, schwer dyspnoisch, es tritt Parese ein, das Tier legt sich auf die Seite und geht nach kurzer Zeit zugrunde
12	11	2 ccm normales Rinderserum	14 „	5 ccm Trypsinverdauungslösung	keine Erscheinungen
			15 „	dasselbe	keine Erscheinungen
13	12	2 ccm Trypsinverdauungslösung	36 „	5 ccm natives Rinderserum	keine Erscheinungen
				nach 2 Stunden 5 ccm eingedampfter Trypsinverdauungslösung	keine Erscheinungen
			37 „	5 ccm derselben Lösung	keine Erscheinungen

Es ergibt sich aus den eben angeführten Versuchen, daß auch relativ weit durch Trypsin-Soda-Verdauung aufgespaltenes Rinderserumeiweiß zuweilen Kaninchen überempfindlich zu machen vermag, und daß bei einem derart vorbehandelten Tiere durch nachträgliche Injektion von nativem Rinderserumeiweiß schwere anaphylaktische Symptome mit tödlichem Ausgange ausgelöst werden können. Diese Erscheinung läßt sich jedoch, wenigstens bei Kaninchen, nur sehr unregelmäßig er-

zeugen, wie neben vielen anderen negativen Versuchen als Beispiel der Versuch 13 zeigt, bei dem selbst ein 5-wöchiger, zwischen Vor- und Nachbehandlung eingeschalteter Zeitraum und die Nachbehandlung mit konzentriertem Trypsinverdauungsgemisch den anaphylaktischen Zustand nicht in Erscheinung zu bringen vermochten. Auch bei Vorbehandlung mit nativem Rinderserum konnten durch die nachträgliche, selbst wiederholte Injektion der Trypsinverdauungslösung keine Erscheinungen der Anaphylaxie festgestellt werden. Dagegen gelang es, durch die passive Uebertragung auf normale Kaninchen den Nachweis für die Bildung eines Reaktionskörpers unter dem Einflusse der Trypsin-Eiweiß-Verdauungsprodukte zu erbringen. Zu diesem Zwecke wurden einem ca. 1200 g schweren Kaninchen (No. 325) 2 ccm des Trypsinverdauungsgemisches subkutan eingespritzt, dieses Tier nach 3 Wochen entblutet und das in zitronensaurem Natron aufgefangene Blut sofort intraperitoneal mehreren Kaninchen (Kaninchen No. 500, 111, 368) beigebracht, welche dann nach 24 Stunden mittels abermaliger, und zwar intravenöser Injektion auf Anaphylaxie geprüft worden sind. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die betreffende Versuchsreihe.

Tabelle V.

Versuchs-No.	Intraperitoneale Vorbehandlung mit dem Citratblute des Kaninchens No. 325	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
14	Kaninchen No. 500 erhält 8 ccm Citratblut	5 ccm am Wasserbade eingengter Trypsinverdauungslösung	—	keine Erscheinungen
15	Kaninchen No. 111 wie oben	6 ccm nativen Rinderserums	—	keine Erscheinungen
		—	5 ccm nativen Rinderserums	2 Stunden nach der Injektion Parese und Tod
16	Kaninchen No. 368 wie vorher	6 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung	—	keine Erscheinungen
		—	5 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung	keine Erscheinungen

Es ergibt sich aus Versuch No. 15, daß in der Tat die passive Uebertragung eines unter dem Einflusse der Trypsin-verdauungslösung gebildeten anaphylaktischen Reaktionskörpers stattgefunden hatte, wie aus dem positiven Ausfall der anaphylaktischen Reaktion zu ersehen ist. Die Auslösung der anaphylaktischen Symptome war jedoch auch hier, wie in Versuch No. 11 der Tabelle IV, nur durch Nachbehandlung mit nativem Rinderserum gelungen; auch ist es bemerkenswert, daß die Auslösung nicht sofort nach der Seruminjektion gelungen ist, sondern daß es einer zweiten intravenösen Serum-injektion nach 24 Stunden noch bedurfte, um eine schwere anaphylaktische Reaktion hervorzurufen.

Es hat sich bereits aus den Untersuchungen Yamanoichis über Tuberkulinanaphylaxie ergeben, daß bei der passiven Uebertragung der Tuberkuloseüberempfindlichkeit nicht immer das Auftreten des anaphylaktischen Vergiftungsbildes durch die erste Tuberkulininjektion gelingt, sondern daß sehr häufig erst eine in 24-stündigem Intervalle der ersten Injektion nachfolgende zweite Tuberkulininjektion das typische anaphylaktische Symptomenbild zu erzeugen vermag. Es werden bei der zweiten Injektion erst in den Zellen die günstigen Bedingungen für das Einsetzen der Giftwirkung entweder vorgefunden oder neu geschaffen. Diese künstliche Steigerung der Uebermpfindlichkeit gelingt auch bei der wiederholten intravenösen Injektion von Eiweißkörpern und deren Derivaten, wie der oben angeführte Versuch zeigt. Aber nicht allein bei der passiven Uebertragung, sondern auch bei der frühen Auslösung anaphylaktischer Symptome aktiv vorbehandelter Tiere gelingt es auf diese Weise, durch eine wiederholte Injektion frühzeitig anaphylaktische Giftwirkungen zu erzeugen und so die Phase des präanaphylaktischen Stadiums abzukürzen. Als Beispiele mögen folgende mit Pferdeserum ausgeführte Versuche dienen:

Kaninchen No. 161 erhält am 20. Aug. 1908 2 ccm natives Pferdeserum intraperitoneal; am 26. Aug. werden ihm behufs Prüfung der Anaphylaxie 5 ccm nativen Pferdeserums intravenös injiziert; nach der Injektion keine Symptome; am 27. Aug. erhält das Tier abermals 5 ccm Pferdeserum intravenös; diesmal tritt kurze Zeit nach der Injektion Parese auf,

die sich allmählich steigert; es folgen Krämpfe und Tod des Tieres.

Kaninchen No. 147 wird den 25. Aug. mit 2 ccm Pferdeserum intraperitoneal vorbehandelt; am 1. Sept. wird dieses Tier entblutet und 5 ccm des defibrinierten Blutes am 2. Sept. einem normalen Kaninchen No. 37 behufs Uebertragung des anaphylaktischen Reaktionskörpers intraperitoneal eingespritzt; 24 Stunden später werden diesem Kaninchen 5 ccm normalen Pferdeserums eingespritzt, ohne irgendwelche Symptome hervorzurufen; eine zweite, 24 Stunden später erfolgte intravenöse Injektion von abermals 5 ccm normalen Pferdeserums erzeugt typische anaphylaktische Symptome und den Tod des Tieres.

Kaninchen No. 131 erhält am 26. Aug. 2 ccm Pferdeserum intraperitoneal; am 2. Sept. wird das Tier durch Entbluten getötet und das defibrinierte Blut zu je 5 ccm zwei Kaninchen behufs passiver Uebertragung intraperitoneal eingespritzt; beide Tiere zeigen nach der ersten, am nächsten Tage erfolgten intravenösen Injektion von 5 ccm normalen Pferdeserums keine Symptome; erst eine zweite, am nächstfolgenden Tage ausgeführte intravenöse Injektion von je 5 ccm Pferdeserum ruft bei beiden Tieren typische anaphylaktische Symptome und Tod hervor; daß nicht etwa die zweimalige Injektion von Pferdeserum irgendwelche den anaphylaktischen ähnliche Giftwirkungen erzeugt, beweist der nachfolgende Kontrollversuch, in dem zur Vorbehandlung statt Pferdeserum Ziegenserum diente.

Kaninchen No. 171 wird am 20. Aug. mit 2 ccm Ziegenserum intraperitoneal vorbehandelt; am 26. Aug. und am 27. Aug. erfolgt eine intravenöse Injektion von je 5 ccm normalen Pferdeserums; beide Injektionen werden völlig symptomlos vertragen.

Diese Versuche zeigen, daß durch eine mehrmalige Nachbehandlung die Reaktionsfähigkeit der Körperzellen scheinbar erhöht wird; indes ist auch der Umstand zu berücksichtigen, daß, wie dies bereits Otto in seiner vortrefflichen Abhandlung hervorhebt, bei der passiven Uebertragung der Ueberempfindlichkeit die Wirksamkeit der anaphylaktischen Sera deutlicher zutage tritt, wenn nicht am nächsten Tage, sondern erst in den späteren Tagen die Nachbehandlung vorgenommen

wird. Wir hätten es daher nicht notwendig etwa mit einer durch wiederholte Injektion gesteigerten Empfindlichkeit der Zellen zu tun; dieselbe könnte ebenfalls durch die längere Einwirkung des anaphylaktischen Blutes auf die Körperzellen erklärt werden. Doch scheint uns, daß bei der Abkürzung der präanaphylaktischen Phase in Fällen der aktiven Anaphylaxie der wiederholten Injektion ebenfalls eine gewisse Rolle nicht abgesprochen werden kann, worauf wenigstens der eine angeführte Versuch (Kaninchen No. 161) hinweisen würde.

Die Tatsache, daß die Auslösung der Anaphylaxie bei einem Tiere, welches mit abgebauten Trypsinverdauungsprodukten von Rinderserumeiweiß vorbehandelt war, durch natives Rinderserumeiweiß gelingen kann, zeigt auch hier wieder, wie bei den Versuchen mit Wittepepton, daß die Zustandsspezifität keinen nennenswerten Einfluß auf die Reaktion ausübt. Der Umstand, daß mit den Trypsinverdauungsprodukten selbst die Vergiftungssymptome nicht erzielt werden konnten, während die Sensibilisierung gelang, könnte wohl damit leicht zu erklären sein, daß für die Sensibilisierung äußerst geringe Substanzmengen genügen, während zur Auslösung des anaphylaktischen Vergiftungsbildes die plötzliche Ueberschwemmung des Organismus mit einer großen Menge des betreffenden spezifisch wirkenden Stoffes nötig ist; der letztere dürfte nicht in der entsprechenden Konzentration unter den Trypsinverdauungsprodukten mehr zu finden sein, dagegen ist dessen Menge hinreichend, um Tiere zu sensibilisieren. Dabei müssen wir es jedoch dahingestellt sein lassen, ob es sich etwa um zwei verschiedene Körper handelt, von denen der eine, das Sensibilisinogen, trypsinest ist, während der andere, das Antisensibilisin, durch Trypsin zerstört würde, oder ob es sich um eine durch Trypsin zerstörbare Substanz handelt, deren noch intakte Reste für die sensibilisierende Wirkung, aber nicht mehr für die Auslösung der Giftwirkung ausreichen. Denn es muß besonders betont werden, daß unter unseren hier nicht weiter angeführten zahlreichen und vielfach variierten Versuchen, mit Trypsinverdauungsprodukten Tiere zu sensibilisieren und anaphylaktische Symptome auszulösen sowohl bei der aktiven Behandlung, wie auch bei der passiven Uebertragung, es uns nur relativ

selten gelang, einwandfreie, typische Symptome der Anaphylaxie zu erhalten, so daß angenommen werden muß, daß intensive Trypsinverdauung des Rindereiweißes zweifellos eine schwere Schädigung, wenn auch nicht völlige Zerstörung der betreffenden spezifischen Wirkungen herbeiführt. Endlich mag noch darauf hingewiesen werden, daß im Gegensatze zum aktiven Rinderserumeiweiß die Nachbehandlung mit 10-proz. Wittepeptonlösung bei einem Tiere, auf welches durch Trypsinverdauungsprodukte erzeugtes anaphylaktisches Serum übertragen worden war, keine Giftsymptome hervorrief; doch möchten wir auch hier aus diesem negativen Befunde vorläufig keine weiteren Schlüsse ableiten.

#### **C. Versuche mit nitriertem und jodiertem Rinderserumeiweiß.**

Die Wahl derjenigen Eiweißderivate, in denen in dem aromatischen Kern eine Nitrogruppe oder Jod eingeführt worden war, fand aus zwei Gründen statt. Einmal war es von Interesse, ob trotz der tief eingreifenden Behandlung, wie z. B. durch konzentrierte Salpetersäure oder das Jodierungsverfahren in schwefelsaurer Lösung, die wirksamen Stoffe nicht zerstört würden, und ferner, in welcher Weise die Spezifität beeinflusst wird, da sich bei den Präzipitinogenen durch das Eintreten der  $\text{NO}_2$ - oder Jodgruppe in den aromatischen Kern des Eiweißes die originäre Spezifität nahezu völlig zum Verschwinden bringen ließ, während sich gleichzeitig eine neue, durch die Substitution im aromatischen Kern entstandene, konstitutive Spezifität ausbildete.

##### **a) Versuche mit nitriertem Rinderserumeiweiß.**

100 ccm Rinderserum wurden mit dem doppelten Volumen konzentrierter Salpetersäure unter Harnstoffzusatz nach der Methode Obermayer-v. Fürth nitriert; der durch Ausgießen der nitrierten Flüssigkeit in mehrere Liter  $\text{H}_2\text{O}$  entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, abgepreßt, in Soda gelöst und mit Essigsäure gefällt. Dieser Niederschlag wurde abermals gewaschen, abgepreßt, in 100 ccm Wasser unter Sodazusatz zu einer klaren, gelb gefärbten Lösung gebracht und zu den nachstehenden Versuchen verwendet; das Präparat wurde, um möglichst frische Lösungen ver-



wenden zu können, in der angegebenen Weise zu neuen Versuchen stets frisch dargestellt.

Die Lösungen, welche zum Teil subkutan, zum Teil intraperitoneal und intravenös den Kaninchen beigebracht worden sind, hatten in den verwendeten Mengen von 2—5 ccm keinerlei Giftwirkungen ausgeübt. Die Tiere vertrugen die Xanthoproteinlösungen recht gut.

### 1. Versuche zur Erzeugung der aktiven Anaphylaxie.

Tabelle VI.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Subkutane Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
17	Kan. No. 87	2 ccm nitriertes Rinderserumeiweiß	15 Tagen	5 ccm nitriertes Rinderserumeiweiß	leichte Dyspnoë, sonst keine Erscheinungen
18	Kan. No. 33	dasselbe	15 „	5 ccm nitriertes Kaninchen-serumeiweiß	keine Symptome
			16 „	dasselbe	„ „
			2 Stunden später, wie vorher	5 ccm nitriertes Rinderserumeiweiß	„ „
19	Kan. No. 34	dasselbe	15 Tagen	5 ccm normales Rinderserum	keine Erscheinungen
			16 „	dasselbe	„ „
			2 Stunden später, wie vorher	5 ccm nitriertes Rinderserumeiweiß	„ „
20	Kan. No. 36	dasselbe	14 Tagen	dasselbe	schwere Dyspnoë, Tier erholt sich nach 1 Stunde
			15 „	dasselbe	$\frac{1}{3}$ Stunde nach der Injektion einsetzende schwere Dyspnoë, die wieder vorübergeht
			19 „	dasselbe	keine Erscheinungen

Es traten in keinem der Versuche deutliche und einwandfreie anaphylaktische Symptome hervor; nur in dem Versuche 20 zeigte das Versuchstier schwere Dyspnoë, die möglicherweise auf das Entstehen der Anaphylaxie zu beziehen ist.

Der negative Ausfall der Versuche konnte dadurch veranlaßt sein, daß eine zu kurze Zeit zwischen Vor- und Nachbehandlung verstrichen war, und wir haben daher bei den folgenden, die passive Uebertragung betreffenden Versuchen eine längere Pause zwischen Vorbehandlung und Uebertragung eintreten lassen. Zu diesem Zwecke wurde ein ca. 2 kg schweres Kaninchen (No. 350) mit 2 ccm nitriertem Rinderserumeiweiß subkutan vorbehandelt, nach 3 Wochen entblutet, das Blut in 1-proz. Natriumcitratlösung aufgefangen und in der 5 ccm Blut entsprechenden Menge durch intraperitoneale Injektion an Kaninchen im Gewichte von 500—700 g übertragen.

## 2. Versuche behufs passiver Uebertragung der Anaphylaxie.

Tabelle VII.

Versuchs-No.	Intraperitoneale Vorbehandlung mit dem Citratblute des Kaninchens No. 350	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
21	Kaninchen No. 83, 8 ccm Citratblut	5 ccm normales Rinderserum —	— 5 ccm normales Rinderserum	schwere Dyspnoë, Tier erholt sich schwere Dyspnoë, allgemeine Parese, nach etwa 1 Stunde erholt sich das Tier
22	Kaninchen No. 84, 8 ccm Citratblut	5 ccm normales Rinderserum —	— 5 ccm normales Rinderserum	schwere Dyspnoë " "
23	Kaninchen No. 154, 8 ccm Citratblut	5 ccm einer 10-proz. Lösung von Rinder-serumxantho-protein —	— 5 ccm einer 10-proz. Lösung von Rinder-serumxantho-protein	keine Erscheinungen " "
24	Kaninchen No. 188, 8 ccm Citratblut	5 ccm einer 10-proz. Jod-rinder-serum - Eiweiß-lösung —	— 5 ccm einer 10-proz. Jod-rinder-serum - Eiweiß-lösung	" " " "

Ein zweiter analoger Versuch mit einem Kaninchen (No. 155), das mit 2 ccm Rinderxanthoprotein intraperitoneal vorbehandelt und nach 23 Tagen entblutet worden war, ergab nachfolgendes Resultat:

Tabelle VIII.

Versuchs- No.	Vorbehandlung mit dem defibrinierten Blute des Kaninchens No. 155	Intravenöse Nachbehandlung nach 24 Stunden mit	Versuchsergebnis
25	Kaninchen No. 16: 5 ccm defibriniertes Blut intravenös	5 ccm 10-proz. Rinder- serumxanthoprotein	sofort nach der Injek- tion schwere Dyspnoë, dann allgemeine Parese und Tod
26	Kaninchen No. 150: 5 ccm defibriniertes Blut intraperitoneal	5 ccm normales Rinder- serum	keine Erscheinungen
27	Kaninchen No. 32: 5 ccm defibriniertes Blut intraperitoneal	5 ccm 10-proz. Rinder- serumxanthoprotein	keine Erscheinungen

Bei dem Ueberblick der angeführten Versuche, die aus einer noch größeren Zahl völlig negativer herausgegriffen sind, ergibt sich, daß es in drei Fällen gelungen ist, und zwar zweimal bei Nachbehandlung mit normalem Rinderserum, einmal auch bei Nachbehandlung mit Xanthoprotein, typische oder deutliche Zeichen der Anaphylaxie zu erhalten. Die größere Zahl der Versuche verlief jedoch, ohne daß die Tiere irgendwelche anaphylaktische Krankheitserscheinungen gezeigt hätten. Wenn also auch die Resultate inkonstante sind, so muß doch bezüglich der Natur der die Anaphylaxie bedingenden Körper aus den Versuchen gefolgert werden, daß es sowohl gelingen kann, mit durch konzentrierte Salpetersäure verändertem Eiweiße Tiere zu sensibilisieren, als auch die so vorbehandelten Tiere mit demselben Präparat spezifisch zu vergiften, was immerhin auf einen hohen Grad der Widerstandsfähigkeit der Substanzen hinweist, denen die angeführten Eigenschaften innewohnen. Aus dem Umstande, daß die mit sorgfältig gereinigtem Xanthoprotein sensibilisierten Tiere mit normalem Rinderserumeiweiß unter typischen anaphylaktischen Symptomen vergiftet werden konnten, ergibt sich wiederum,

daß die Zustandsspezifität bei dem anaphylaktischen Prozesse zurücktritt oder wenigstens keine derartige Bedeutung hat, wie bei der Präzipitinreaktion. Wie weit es möglich ist, durch heterogene Xanthoproteinlösungen, die mit irgendeiner artfremden Xanthoproteinlösung sensibilisierten Tiere anaphylaktisch zu vergiften, müßte noch besonders in einer größeren Versuchsreihe untersucht werden, da sich bekanntlich bei der Präzipitinreaktion durch die Untersuchungen von Obermayer und Pick ergeben hat, daß durch den Eintritt der  $\text{NO}_2$ -Gruppe in den aromatischen Kern des Eiweißes die Art-spezifität (originäre Gruppierung) nahezu völlig aufgehoben werden kann. Der eine diesbezüglich angestellte Versuch (Versuch No. 18, Tabelle VI), in welchem einem mit Rinderxanthoprotein sensibilisierten Kaninchen zur Nachbehandlung behufs Auslösung der anaphylaktischen Vergiftungssymptome Kaninchenxanthoprotein intravenös eingespritzt wurde, ergab ein negatives Resultat, welches wohl schon deshalb nicht viel besagen kann, weil andere Versuche auch bei Nachbehandlung mit Rinderxanthoprotein vielfach erfolglos blieben.

b) Versuche mit jodiertem Rinderserumeiweiß.

Haben die eben angeführten Versuche gezeigt, daß nitrierte Eiweißkörper, wenn auch nicht regelmäßig, sowohl sensibilisierend wirken können, als auch das anaphylaktische Vergiftungsbild auszulösen vermögen, so verhielten sich die mit jodiertem Eiweiß vorbehandelten Tiere ganz analog; sie zeigten vielleicht nur darin einen geringen Unterschied, daß die Erscheinungen der Anaphylaxie noch schwerer und seltener auszulösen waren, als bei den mit Xanthoprotein behandelten Tieren und daß auch die Vergiftungssymptome viel milder verliefen. Bemerkt muß von vornherein werden, daß die intravenöse Injektion von 5 ccm unserer Jodeiweißlösung bisweilen bei kleinen normalen Kaninchen eine allerdings bald vorübergehende Unruhe und leichte Dyspnoë hervorrief, die jedoch rasch völligem Wohlbefinden wich.

Das Jodrinderserumeiweiß wurde nach dem Hofmeister-schen Jodierungsverfahren dargestellt. 200 ccm Rinderserum wurden mit 10 g Jodkalium, 5 g jodsaurem Kalium und 20 ccm 20-proz. Schwefelsäure versetzt und 4 Stunden auf dem Wasser-

bade im Kolben mit Steigrohr erhitzt; der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, abgepreßt, in ca. 1,5 Liter Wasser unter Ammoniakzusatz gelöst, abermals klar filtriert und das Filtrat mit Essigsäure gefällt; der weiße flockige Niederschlag wurde aufs Filter gebracht, jodfrei gewaschen, gut abgepreßt und in 150 ccm Wasser unter vorsichtigem Zusatz von einigen Tropfen Soda gelöst, so daß die Reaktion nur leicht alkalisch war. Diese Lösung wurde sowohl zur Vorbehandlung wie zur Nachbehandlung der Tiere verwendet. Es wurde versucht, sowohl auf aktivem Wege, wie auch durch passive Uebertragung Anaphylaxie zu erzielen; aus einer größeren Anzahl seien nachfolgende Versuchsprotokolle tabellarisch wiedergegeben.

### 1. Aktive Erzeugung der Anaphylaxie.

Tabelle IX.

Versuchs-No. Kaninchen No.	Subkutane Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach	mit	
28	2 ccm Jodrinder-eiweiß	10 Tagen	5 ccm Jodrinder-eiweiß	schwere Dyspnoë u. Parese, Tod nach $\frac{1}{2}$ Stunde
29	2 ccm Jodrinder-eiweiß	11 „	5 ccm normales Rinderserum-eiweiß	keine Erscheinungen
		2 Stunden später	5 ccm Jodrinder-eiweiß	leichte Dyspnoë, hierauf Parese; Tier erholt sich; 48 Stunden später tot aufgefunden
30	2 ccm Jodrinder-eiweiß	14 Tagen	5 ccm Jodrinder-eiweiß	keine Erscheinungen

### 2. Passive Uebertragung der Anaphylaxie.

Am 14. Aug. 1908 wurden dem Kaninchen No. 385 subkutan 2 ccm Jodrindereiweiß injiziert; den 7. Sept., also nach drei Wochen wurde das Tier aus der Arteria femoralis entblutet und das in zitronensaurem Na aufgefangene Blut zu je 10 ccm nachfolgenden Kaninchen intraperitoneal beigebracht.

Tabelle X.

Versuchs-No.	Intraperitoneale Uebertragung des Citratplasmas vom Kaninchen No. 385 auf	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
31	Kaninchen No. 182 erhält 10 ccm Citratplasma	5 ccm Jodrinder-eiweiß —	— 5 ccm Jodrinder-eiweiß	keine Symptome keine Symptome; am nächsten Morgen tot aufgefunden
32	Kaninchen No. 134 wie oben	5 ccm natives Rinderserum-eiweiß —	— 5 ccm natives Rinderserum-eiweiß	schwere Dyspnoë u. Parese, Tier erholt sich zuerst leichte Dyspnoë, später Tier schwer krank
33	Kaninchen No. 124 wie oben	8 ccm 10-proz. Rinderxanthoproteinlösung —	— 5 ccm Rinderxanthoprotein	keine Symptome keine Symptome
34	Kaninchen No. 156 wie oben	5 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung —	— 5 ccm 10-proz. Wittepeptonlösung	keine Symptome keine Symptome

Eine zweite, ganz analoge Versuchsreihe hatte ein durchaus negatives Ergebnis. Man ersieht auch hier, daß die Erscheinungen der Anaphylaxie mit jodiertem Rindereiweiß nur sehr unregelmäßig auszulösen sind; doch ist es immerhin in einigen Fällen der aktiven wie auch der passiven Anaphylaxie gelungen, sowohl bei Nachbehandlung mit Jodrinder-eiweiß als auch mit normalem Rinderserumeiweiß typische anaphylaktische Symptome zu erhalten. Wir würden uns daher der Ansicht zuneigen, daß sowohl der Jodierungs- wie auch der Nitrierungsprozeß nicht imstande waren, die an dem Phänomen der Anaphylaxie beteiligten Substanzen völlig zu zerstören, sondern daß vielmehr die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber diesen zweifellos in ihrer Wirkung abgeschwächten Präparaten eine wechselnde ist; abgesehen davon, daß, wie übereinstimmend alle Autoren beobachteten, bei der Ana-

phylaxie individuellen Schwankungen in der Empfindlichkeit der Versuchstiere überhaupt eine große Bedeutung zukommt, muß bei den jodierten und nitrierten Eiweißkörpern auch ins Auge gefaßt werden, daß durch den Eintritt der Jod- resp. der Nitro-Gruppe in den aromatischen Kern des Eiweißes pharmakodynamische Prozesse im Tierkörper ausgelöst werden können, welche möglicherweise die Erscheinungen der Anaphylaxie zu beeinflussen imstande sind.

#### D. Versuche mit Serumlipoiden.

Aus den bisherigen Versuchen ergibt sich zum erstenmal, daß sowohl eine anaphylaktisierende, resp. sensibilisierende als auch eine toxische Wirkung erzeugt werden kann mit peptischen und tryptischen Spaltungsprodukten des Rinderserumeiweißes sowie mit nitriertem und jodiertem Rinderserumeiweiß. Es zeigte sich ferner, daß entgegen der allgemeinen Annahme auch die toxische Wirkung bei sensibilisierten Tieren durch sehr resistente, vor allem hitzebeständige und gegen fermentative wie auch andere chemische Eingriffe äußerst widerstandsfähige Körpergemenge erzeugt werden kann, die freilich immer ihren kolloidalen Charakter und wohl auch ihre Eiweißnatur beibehielten. Es war nun für uns von Interesse, zu prüfen, wie sich die alkohollöslichen Bestandteile des Serums verhielten, die nach den Untersuchungen des einen von uns einen kolloidalen Charakter besitzen und dabei, falls auf die möglichst vollständige Entfernung des Serumeiweißes besonders geachtet wird, nur äußerst geringe, unter Umständen auch biologisch schwer nachweisbare Mengen von Eiweiß enthalten. Diese alkohollöslichen Substanzgemenge wurden in der Weise gewonnen, daß Pferdeserum oder Rinderserum mit dem dreifachen Volumen 95-proz. Alkohols gefällt wurden; das vom entstandenen Niederschlag abfiltrierte alkoholische Filtrat wurde auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft und der so gewonnene Rückstand nochmals mit warmem 95-proz. Alkohol extrahiert; durch diese zweimalige Extraktion wurde der größte Teil der Salze und die durch das Eindampfen auf dem Wasserbade koagulierten Eiweißreste entfernt. Dieses zweite alkoholische Extrakt wurde auf dem Wasserbade abermals zur Trockene eingedampft und der Trockenrückstand in

Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Man erhält auf diese Weise eine selbst in größeren Konzentrationen völlig homogene Emulsion, die kein nachweisbares koagulables Eiweiß enthält und keine Biuretreaktion gibt. Mittels dieser aus Rinderserum wie auch aus Pferdeserum gewonnenen Präparate, die wir nach dem herrschenden Sprachgebrauch als Rinderserumlipoide und Pferdeserumlipoide bezeichnen, wurden Kaninchen vorbehandelt. Die Konzentration der angewendeten Lipoidaufschwemmungen war dabei derart gewählt, daß die aus etwa 700—800 ccm Serum gewonnenen Lipoiden in ca. 30—40 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulgiert worden waren.

Zunächst wurde versucht, ob es gelänge, durch einmalige Vorbehandlung mit Rinderlipoiden die Bildung eines „anaphylaktischen Reaktionskörpers“ zu erzielen und denselben, sei es durch die Nachbehandlung des sensibilisierten Tieres, sei es durch Uebertragung auf ein Normaltier, nachzuweisen. Zu diesem Behufe wurden 2 Kaninchen (Kaninchen No. 56 und 58) mit je 3 ccm der Lipoidaufschwemmung subkutan injiziert; dem Kaninchen No. 56 wurden 16 und 17 Tage später intravenös je 5 ccm normalen Rinderserums, ferner nach 1 Stunde 6 ccm der Rinderlipoidaufschwemmung und nach 24 Stunden abermals 5 ccm normalen Rinderserums injiziert; nach keiner der drei intravenösen Injektionen traten irgendwelche Krankheitserscheinungen bei dem Versuchstiere auf. Ein gleich negatives Resultat hatte der Versuch der passiven Uebertragung mit dem defibrinierten Blute des Kaninchens No. 58, welches 3 Wochen nach der Injektion entblutet worden war. Das teils intravenös, teils intraperitoneal normalen Kaninchen applizierte Blut vermochte, wie die nachfolgenden Versuche zeigen, nicht Anaphylaxie zu übertragen (siehe Tabelle XI, p. 703).

Dagegen ließen sich günstigere Resultate erzielen, als wir die Versuchsanordnung in der Weise modifizierten, daß wir Kaninchen nicht einmal, sondern längere Zeit hindurch subkutan mit Rinder- und Pferdellipoiden vorbehandelten und das Serum dieser Tiere zur Uebertragung auf normale Kaninchen benutzten. So wurde ein Kaninchen (No. 91) von 3350 g Gewicht in 3- bis 5-tägigen Intervallen vom 3. Juli bis 14. Aug. 1908



Tabelle XI.

Versuchs-No.	Vorbehandlung mit dem defibri- nierten Blute des Kaninchens No. 58	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
35	Kaninchen No. 87 5 ccm defibri- niertes Blut in- travenös	5 ccm normales Rinderserum —	— 5 ccm normalen Rinderserums	keine Erscheinungen „ „
36	Kaninchen No. 111 5 ccm defibri- niertes Blut in- traperitoneal	5 ccm normales Rinderserum —	— 5 ccm normalen Rinderserums	„ „ „ „
37	Kaninchen No. 135 wie vorher	5 ccm normales Rinderserum —	— 5 ccm normalen Rinderserums	„ „ „ „

subkutan mit je 5 ccm Pferdelipoiden injiziert und das Tier am 22. Aug. aus der Art. femoralis entblutet. Das erhaltene Serum dieses Tieres hatte, wie dies besondere in Gemeinschaft mit O. Schwarz ausgeführte Untersuchungen des einen von uns zeigten, keine Fähigkeit, mit normalem Pferdeserum eine Präzipitinreaktion zu geben, vermochte dagegen zum Unterschiede von normalem Kaninchenserum mit Lipoiden, sowie mit Lipoideiweißemulsionen Niederschläge zu erzeugen. Dieses Serum wurde nun zur passiven Uebertragung auf normale Kaninchen im Gewichte von 600—700 g mittels intraperitonealer Injektion in Mengen von je 5 ccm verwendet. Es ergaben sich die im folgenden zusammengestellten Versuchsergebnisse (siehe Tabelle XII auf p. 704).

Ein analoger Versuch wurde mit dem Serum eines Tieres (Kaninchen No. 53, 2000 g schwer) ausgeführt, welches in gleichen Intervallen, wie das Kaninchen No. 91, mit Rinderserumlipoid-Aufschwemmungen gespritzt worden war. Dieses Serum war zum Unterschiede von dem bei der Vorbehandlung mit Pferdeserumlipoiden gewonnenen Serum imstande, mit nativem Rinderserum, eine wenn auch, mit Rücksicht auf die vom 3. Juli bis 3. Sept. währende lange Dauer der Vorbehandlung, äußerst spärliche, nach mehreren Stunden auftretende Präzipitation in den Verdünnungen von 1:50 bis

Tabelle XII.

Versuchs-No.	Intraperitoneale Vorbehandlung mit dem Serum von Kaninchen No. 91	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
38	Kaninchen No. 92 erhält 5 ccm Serum intraperitoneal	4 ccm einer homogenen, durch Papierfiltrierten Pferdeserum-lipoidemulsion	—	schwere Dyspnoë, die ca. 2 Stunden andauert, dann erholt sich das Tier
		—	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie früher	schwere Dyspnoë, die sich allmählig steigert, dann Parese; Tod nach 2 1/2 Stunden
39	Kaninchen No. 162, wie vorher	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie vorher	—	schwere, 1/2 Stunde andauernde Dyspnoë; dann Tier völlig normal
		—	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie vorher	keine Erscheinungen
40	Kaninchen No. 133, wie vorher	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie vorher	—	schwere Dyspnoë, welche nach 1/3 Stunde vorbeigeht, doch macht das Tier einen schwerkranken Eindruck; am nächsten Tag ist es völlig erholt
		—	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie vorher	keine Erscheinungen
41	Kontrolltier No. 85, nicht vorbehandelt	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie früher	—	keine Erscheinungen
		—	5 ccm Pferdeserumlipoide, wie früher	keine Erscheinungen

1:200 zu geben; mit gekochtem Rinderserum war keine Präzipitation zu erzielen. Dieses Serum verhielt sich bei den Uebertragungsversuchen folgendermaßen (siehe Tabelle XIII auf p. 705).

Beim Ueberblick der beiden letzten Tabellen XII und XIII ergibt sich, daß auch die aus dem Pferde- und Rinderserum dargestellten alkohollöslichen Stoffe zur Bildung eines anaphylaktischen Reaktionskörpers führen können, der passiv übertragen werden kann, so daß ein schwerer, bisweilen tödlich endender anaphylaktischer Symptomenkomplex bei

Tabelle XIII.

Versuchs-No.	Intraperitoneale Vorbehandlung mit dem Serum von Kaninchen No. 53	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
		nach 24 Stunden mit	nach 48 Stunden mit	
42	Kan.No. 162 erhält 5 ccm Serum intraperitoneal	5 ccm normales Rinderserum	—	nach wenigen Minuten schwere Dyspnoë, Tier legt sich auf die Seite und stirbt unter Krämpfen
43	Kan.No. 436 erhält 5 ccm Serum intraperitoneal	5 ccm normales Pferdeserum	—	keine Erscheinungen
44	Kan.No. 166 erhält 5 ccm Serum intraperitoneal	5 ccm einer durch Papier filtrierten Rinderserum-lipoid-Aufschw.	—	keine Erscheinungen
		—	5 ccm derselben Rinderlipoid-aufschwemmung.	schwere Dyspnoë, Tier erholt sich
45	Kontroll-Kaninch. No. 106 nicht vorbehandelt	5 ccm einer Rinderlipoid - Aufschwemmung	—	keine Erscheinungen

derart behandelten Tieren ausgelöst werden kann. Die Auslösung gelingt sowohl durch Nachbehandlung mit normalem Pferdeserum, resp. Rinderserum, als auch zuweilen mit den entsprechenden Lipoiden; die Reaktion selbst ist, wie aus den Versuchen No. 42 und 43 der letzten Tabelle hervorgeht, artspezifisch, da bei Vorbehandlung mit Rinderlipoiden die Auslösung der Anaphylaxie nur mit Rinderserum oder mit Rinderlipoiden, aber nicht mit Pferdeserum gelingt. Es geht demnach aus den [angeführten Versuchen mit Sicherheit hervor, daß auch mit lipoidartigen, aus dem Blutserum dargestellten Verbindungen spezifische, anaphylaktische Prozesse erzeugt werden können. Es reiht sich dieser Befund anderen Beobachtungen an, die der eine von uns, ferner Pick und Přibram, Pick und Schwarz, sowie auch Levaditi und Muttermilch bei verschiedenen anderen Immunprozessen bezüglich der Beteiligung alkohol- und ätherlöslicher Körper an den betreffenden Phänomenen anstellen konnten. Doch muß auch hier wieder, wie bereits

an anderer Stelle<sup>1)</sup>, betont werden, daß die Entscheidung der Frage, ob an den hier beobachteten Erscheinungen ausschließlich fettähnliche Kolloide ohne Eiweißkörper beteiligt seien, bei dem Umstande, daß die Erzeugung der Anaphylaxie häufig mit den minimalsten Eiweißdosen gelingt — konnten doch Rosenau und Anderson noch bei Anwendung von  $\frac{1}{1000\ 000}$  ccm Diphtheriepferdeserum eine deutliche Anaphylaxie bewirken — eine ungeheuer schwere ist, da der Nachweis der Eiweißkörper selbst mit Hilfe der empfindlichsten Reaktionen zum Teil wegen der großen Verdünnung des Eiweißes, zum Teil wegen seiner völlig veränderten Lösungsbedingungen mehr minder versagt oder unsicher wird. Wir können allerdings in den hier mitgeteilten Versuchen geltend machen, daß trotz 6—8-wöchentlicher Vorbehandlung der Kaninchen No. 91 und No. 53 sich in dem einen Falle überhaupt keine Eiweißpräzipitine nachweisen ließen, in dem anderen nur eine spurenweise Präzipitinreaktion mit dem Serum des betreffenden Kaninchens zu erzielen war; trotzdem gelang die Erzeugung der Anaphylaxie bei dem passiven Uebertragungsmodus. Wenn also auch die Möglichkeit der Erzeugung anaphylaktischer Erscheinungen durch alkohollösliche Serumlipoide auf Grund unserer Versuche zugestanden werden muß, so scheint uns dennoch die Annahme näherliegend, daß auch hier der Zusammenwirkung von Eiweiß- und Fettverbindungen, wie in den Versuchen von Pick und Schwarz, die wesentlichste Rolle bei dem Entstehen der Anaphylaxie durch sogenannte Serumlipoide zugesprochen werden muß. Es verdient auch hier hervorgehoben zu werden, daß Gay und Adler, welche mit unge reinigten Aetherextrakten des Pferdeserums Meerschweinchen gegen eine Nachbehandlung mit Pferdeserum empfindlich machen konnten, dieses Phänomen nicht mehr zu erzeugen vermochten, als sie den zunächst wirksamen Aetherrückstand nochmals mit wasserfreiem Aether extrahierten. Wie schon früher erwähnt wurde, haben Vaughan und Wheeler aus Eiereiweiß, wie auch aus Bakterienleibern (*Bact. coli*) durch Extraktion mit durch Sodazusatz alkalisiertem absoluten Alkohol bei 78°

1) E. P. Pick, Die Darstellung der Antigene mit chemischen und physikalischen Methoden. In: Kraus-Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung, Bd. 1, 1908.

giftige, alkohol- und wasserlösliche, durch Platinchlorid fällbare Produkte dargestellt, welche bereits bei normalen Meerschweinchen nach intraperitonealer Injektion ein schweres, mit Lähmung des Atmungszentrums einhergehendes Vergiftungsbild analog jenem der anaphylaktischen Tiere erzeugen. Diese Körper vermochten jedoch keine sensibilisierende Wirkung zu entfalten und waren, wie auch die Untersuchungen von Nicolle und Abt an derartigen nach Vaughan und Wheeler aus Pferdeserum dargestellten Körpern zeigen, für Meerschweinchen, die nach Th. Smith mit Pferdeserum überempfindlich gemacht worden waren, nicht toxischer als für normale Tiere; auch Nicolle konnte an diesen Produkten keinerlei sensibilisierende Wirkung beobachten zum Unterschiede von dem alkoholunlöslichen Anteil, mit welchem sowohl das Phänomen nach Arthus als auch eine Ueberempfindlichkeit in dem Sinne nachzuweisen war, daß bei derartig vorbehandelten Tieren nach Applikation von Pferdeserum anaphylaktische Vergiftungssymptome auszulösen waren. Gay und Adler, welche ebenfalls nach der Methode von Vaughan und Wheeler Pferdeserum verarbeiteten, konnten mit dem alkohollöslichen Anteil bei sensibilisierten Tieren überhaupt keine Giftwirkungen auslösen, mit dem alkoholunlöslichen Rest erhielten sie nur leichte Reizerscheinungen. Wir möchten unsere ohne Verwendung von Alkalien dargestellten alkohollöslichen Produkte mit den eben erwähnten „Giften“ von Vaughan und Wheeler schon deshalb nicht ohne weiteres identifizieren, weil sich unsere Produkte für normale Tiere völlig ungiftig erwiesen und trotzdem sowohl eine sensibilisierende, wie auch auf vorbehandelte Tiere spezifisch toxische Wirkung entfalteten. Es scheint uns demnach auf Grund der vorliegenden Untersuchungen die Annahme nicht berechtigt, daß mittels der Alkoholextraktion eine Trennung des Sensibilisinogens und der spezifisch-toxischen, anaphylaktischen Substanz herbeigeführt werden kann und es wird weiterer Versuche noch bedürfen, um festzustellen, in welchen Beziehungen das von Vaughan und Wheeler erhaltene alkohollösliche „Gift“ und jene alkohollöslichen Substanzen zueinander stehen, welche, wie in unseren Versuchen, bei vorbehandelten Tieren spezifische, anaphylaktische Giftwirkungen

erzeugten, als auch normale Tiere zu sensibilisieren vermochten.

**E. Versuche mit Euglobulin und Pseudoglobulin des Rinder- und Pferdeserums.**

Wie bereits früher erwähnt wurde, haben Gay und Adler den Versuch gemacht, durch fraktionierte Aussalzung mit Ammonsulfat eine Reinigung der bei der Erzeugung der anaphylaktischen Erscheinungen beteiligten Substanzen des Pferdeserums zu erzielen und sie fanden, daß die einzelnen, bei der fraktionierten Aussalzung abgeschiedenen Fraktionen eine um so geringere sensibilisierende und um so stärkere toxische Wirkung ausübten, je später sie ausfielen, so daß die bei  $\frac{1}{8}$ -Sättigung ausgefällte Euglobulinfraktion eine sehr hohe sensibilisierende und selbst bei sensibilisierten Tieren keine toxische Wirkung entfaltete (Anaphylaktin nach Gay und Southard), während die im Filtrate der  $\frac{2}{8}$ -Sättigung befindliche Substanz sowohl sensibilisierende, wie auch, sogar für normale Tiere, toxische Wirkungen besaß. Schon früher haben auch Rosenau und Anderson ebenfalls die fraktionierte Ammonsulfatfällung verwendet, um das toxische Prinzip zu isolieren; sie fanden, daß ein nach Gibson behandeltes Diphtherieantitoxin, das also im wesentlichen lösliche Globuline enthielt, sehr wohl imstande war, die mit Diphtherietoxin-Antitoxin vorbehandelten Meerschweinchen anaphylaktisch zu töten. Daß auch das durch Kohlensäure aus dem Serum gefällte Globulin, wie auch dessen Filtrat — allerdings in verschiedenem Grade — sensibilisierende Eigenschaften besitzen, zeigen die Untersuchungen von Doerr und Raubitschek.

Da es prinzipiell von Wichtigkeit ist, ob in der Tat bereits durch die fraktionierte Ammonsulfatfällung eine Trennung des Sensibilisinogens und der toxisch wirkenden anaphylaktischen Substanz möglich ist, haben wir den Versuch angestellt, ein und dasselbe Tier einerseits mittels der einen Serumfraktion vorzubehandeln und andererseits zur Nachbehandlung wiederum eine Serumfraktion zu verwenden, eine Versuchsanordnung, die bis dahin von den Autoren nicht angewendet worden war; es wurde vielmehr derart vorgegangen, daß entweder zur Vorbehandlung oder zur Nachbehandlung der mit der entsprechenden Eiweißfraktion gespritzten Tiere natives Serum

Verwendung fand. Wir benutzten zu unseren Versuchen Rinder- wie auch Pferdesera, aus welchen durch Ammonsulfatfällung Euglobulin und Pseudoglobulin dargestellt worden war. Je 200 ccm Pferde- und Rinderserum wurden mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt (Euglobulin); das Filtrat des erhaltenen Niederschlages wurde durch Zusatz von  $\frac{1}{3}$  Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung auf  $\frac{1}{2}$ -Sättigung gebracht und der so erhaltene Niederschlag (Pseudoglobulin) abermals abfiltriert. Beide Niederschläge wurden gut abgepreßt, nochmals in 200 ccm Wasser gelöst und abermals mit der entsprechenden Menge der salzgesättigten Lösung gefällt; die so erhaltenen, gut abgepreßten Niederschläge wurden in der dem Ausgangsvolumen entsprechenden Wassermenge gelöst und zu den Versuchen verwendet. Von einer größeren Reihe sowohl mit Euglobulin als auch mit Pseudoglobulin vorbehandelten Tieren blieben leider nur die mit Pseudoglobulin gespritzten am Leben. Die Versuchsanordnung und die Versuchsergebnisse gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle XIV.

Versuchs-No.	Kaninchen-No.	Intraperitoneale Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
47	123	3 ccm Pseudoglobulinlösung aus Rinderserum	17 Tagen	5 ccm Euglobulinlösung aus Rinderserum	Sofort nach der Injektion Unruhe, schwere Dyspnoë, hierauf Parese aller Extremitäten; Tier liegt wie tot auf dem Boden, alle Extremitäten von sich gestreckt; nach $\frac{3}{4}$ Stunden erholt sich das Tier
48	131	3 ccm Pseudoglobulinlösung aus Pferdeserum	17 Tagen	5 ccm Euglobulinlösung aus Pferdeserum	Sofort nach der Injektion schwere Dyspnoë, dann Parese aller Extremitäten; Tier bleibt $\frac{3}{4}$ Stunden regungslos am Boden liegen, dann erholt sich das Tier etwas
49	150 Kontrolltier	—	—	5 ccm Euglobulinlösung aus Rinderserum	keine Erscheinungen

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. I.

47

Man ersieht aus den beiden Versuchen, daß sowohl Euglobulinlösungen aus Rinderserum wie aus Pferdeserum bei Kaninchen, die mit Pseudoglobulinlösungen vorbehandelt waren, typische anaphylaktische Vergiftungserscheinungen auslösen konnten und daß somit kein Grund vorliegt, eine Trennung der sensibilisierenden und der die anaphylaktischen Vergiftungssymptome auslösenden Substanz auf Grund des Aussalzungsverfahrens anzunehmen. Es scheint vielmehr das Euglobulin nicht allein die Fähigkeit zu besitzen, Tiere zu sensibilisieren, wie aus den oben angeführten Versuchen anderer Autoren bereits hervorgeht, sondern es besitzt auch, wie sich aus unseren Versuchen ergibt, die Eigenschaft, bei sensibilisierten Tieren eine anaphylaktische Vergiftung zu erzeugen. Es ist möglich, daß der Unterschied der differenten Versuchsergebnisse von Gay und Adler in der verschiedenen Versuchsanordnung, vielleicht auch in der Wahl anderer Versuchstiere (Meerschweinchen) gelegen ist.

#### **F. Versuche mit Immunseren.**

Ging aus den bisher angeführten Versuchen hervor, daß die verschiedenartigsten Derivate der artfremden Eiweißkörper sowohl zu sensibilisieren vermögen, als auch anaphylaktische Giftsymptome auslösen können, so interessierte uns weiterhin mit Bezug auf das Problem der Arteigenheit des Eiweißes die Frage, wie weit das arteigene Serum verändert sein müsse, um sich in ähnlicher Weise wirksam zu erweisen, wie die körperfremden Eiweißstoffe und deren Derivate. Dabei erschien es uns auch vom prinzipiellen Interesse, zu untersuchen, ob bei dem Immunisierungsprozeß an den Eiweißkörpern des immunisierten Tieres irgendwelche Veränderungen in der Art vor sich gehen, daß die betreffenden Serumeiweißkörper dem artgleichen Tiere gegenüber als veränderte reagieren, was wiederum leicht durch Auslösen der Anaphylaxie festzustellen wäre. Trotz der, wie es uns scheint, großen Wichtigkeit derartiger Fragestellung für die Auffassung des Immunisierungsvorganges finden wir kaum irgendwelche einschlägigen experimentellen Anhaltspunkte für das Studium dieser Frage in der Literatur. Es



ist klar, daß die Feststellung der Aenderung des Serumeiweißes unter dem Einflusse des Immunisierungsprozesses nicht allein auf dem Wege der Anaphylaxie versucht, sondern auch auf andere Art einer Entscheidung zugeführt werden kann. Es ist zunächst für die Theorie der Antikörperbildung von einiger Bedeutung, ob die Immunsera in sich abgeschlossene, gewissermaßen gesättigte Reaktionsprodukte darstellen, denen nicht mehr die Eigenschaften desjenigen Antigens zukommen, dessen Wirkung sie selbst ihre Entstehung verdanken, oder ob ihnen gewisse antigene Eigentümlichkeiten auch zukommen, welche unter dem Einflusse des ursprünglichen Antigens und neben den antigenbindenden Fähigkeiten in ihnen zur Entwicklung gelangt sind.

Wir haben in den folgenden Versuchen einerseits geprüft, ob Immunsera imstande sind, bei bereits sensibilisierten Tieren toxische, anaphylaktische Erscheinungen hervorzurufen, andererseits ob durch Immunsera Tiere sensibilisiert werden können und ob bei so vorbehandelten Tieren, sei es wiederum durch Applikation von Immunserum, sei es durch Normalsera Anaphylaxie ausgelöst werden kann. Es war Vorbedingung derartiger Versuche, den Einfluß irgendwelcher artfremder Eiweißkörper, die als Antigene hätten wirken können, auszuschalten; wir haben deshalb Immunsera verwendet, die von Kaninchen stammten, und übertrugen dieselben abermals auf Kaninchen, an welchen letzteren dann die Anaphylaxie studiert werden sollte. Es war weiters der Nachweis zu führen, daß in den so verwendeten Kaninchenimmunseren keine artfremden Eiweißkörper vorhanden waren, die etwa früher zur Herstellung dieser Immunsera gedient hatten. Da wir als Immunsera Immunpräzipitine verwendeten, welche durch Injektion von Kaninchen mit verschiedenen Eiweißkörpern, wie Pferde-, Rinder-, Hunde-, Ziegen- und Katzenserumeiweiß, hergestellt worden waren, so war es nötig, bereits in den verwendeten Immunseren das Vorhandensein von diesen Antigenen auszuschließen. Wir haben zu diesem Behufe die Tiere nach der letzten Einspritzung des betreffenden Serumeiweißes einige Zeit unbehandelt gelassen, so daß zur Zeit des Aderlasses das betreffende Immunserum kein artfremdes, etwa durch die letzte Injektion eingebrachtes,

Serumeiweiß enthielt. Wir überzeugten uns davon überdies durch die Präzipitinreaktion, welche mit den betreffenden Immunseren angestellt worden war und die noch den Nachweis von artfremdem Serumeiweiß in der Verdünnung von 1:10 000 bequem gestattete; alle Immunsera, auf diese Weise geprüft, zeigten keine mittels der Präzipitinreaktion nachweisbare Beimengung von artfremdem Eiweiß. Auf diese Weise konnte wohl mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die in den späteren Versuchen erzielte Wirkung der Immunsera bei Nachbehandlung der sensibilisierten Tiere von artfremdem, etwa den Immunseren nur beigemengtem Eiweiß herrühre, da erfahrungsgemäß (Otto, Rosenau und Anderson) zur Auslösung der anaphylaktischen Giftwirkung größere Mengen fremdartigen Eiweißes nötig sind; bereits viel geringere Eiweißmengen sind dagegen bei Vorbehandlung imstande, normale Tiere zu überempfindlichen zu machen; nach Rosenau und Anderson genügen, wie schon früher angeführt, Mengen von  $\frac{1}{1000000}$  ccm, um bei Meerschweinchen eine deutliche Anaphylaxie zu bewirken. Für Kaninchen ist eine derartige Empfindlichkeitsgrenze nicht festgestellt; indes ergibt sich aus den später anzuführenden Versuchen, daß in unseren Fällen die Sensibilisierung wohl kaum von dem mittels der Präzipitinreaktion nicht mehr nachweisbaren, dem Immunserum beigemengten artfremden Eiweiß herrühren konnte, zumal die geringen Mengen des für die Sensibilisierung verwendeten Immunserums dies von vornherein wenig wahrscheinlich erscheinen ließen.

Die Versuchsanordnung und die Versuchsergebnisse gehen aus nachfolgenden tabellarisch geordneten Versuchsprotokollen hervor. Die verwendeten Immunsera stammten durchwegs von Kaninchen, welche 3—4 Wochen lang durch subkutane Injektion von nativen oder in entsprechender Verdünnung mit Wasser aufgekochten Normalseren (Coctoimmunsera) in Mengen von 2—5 ccm und in Abständen von 5—6 Tagen vorbehandelt worden waren. Nach der letzten Injektion wurde ca. 2—3 Wochen ausgesetzt, das hierauf durch Aderlaß gewonnene Serum wurde in der Regel abermals 4—5 Wochen steril verschlossen bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann zu den Versuchen be-

nutzt. Wir haben zunächst an einigen dieser Immunsera geprüft, ob dieselben freies Sensibilisin (Besredka) resp. einen freien anaphylaktischen Reaktionskörper (nach Otto) enthalten, da dessen Nachweis für unsere Versuche von Wichtigkeit erschien. Es stellte sich heraus, wie die im folgenden mitgeteilten, mit Pferdeimmunserum angestellten Versuche zeigen (siehe folgende Tabelle), daß in diesen Immunseren ein freier anaphylaktischer Reaktionskörper nicht nachzuweisen war, sei es daß derselbe durch die wiederholte Injektion bei gleichzeitigem Eintritt der Antianaphylaxie zugrunde ging (Lewis), sei es daß derselbe vor dem Aderlaß aus dem Tierkörper ausgeschieden oder bei längerem Lagern der Sera, ähnlich wie dies Yamanouchi für Sera Tuberkulöser festgestellt hatte, vernichtet worden war; im Einklange mit Ottos Angaben konnten wir uns dagegen in zahlreichen Versuchen überzeugen, daß der durch Pferde- oder Rinder-serumeiweiß hervorgerufene anaphylaktische Reaktionskörper  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen auf  $56^{\circ}$  ohne Schaden vertrug.

Tabelle XV.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Intravenöse Übertragung von	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
50	385	5 ccm präzipitierenden Pferdekaninchen-Immunserum	24 Stunden	5 ccm normalem Pferdeserum	keine Erscheinungen
51	125	wie früher	24 ..	wie oben	„ „

Diese mit einem ca. 5 Wochen gelagerten Immunserum ausgeführten Versuche scheinen darauf hinzuweisen, daß kein freier anaphylaktischer Reaktionskörper in diesem Immunserum vorhanden war, im Gegensatz zu Pferdeimmunseren, welche Otto und Besredka bei ihren an Meerschweinchen ausgeführten Versuchen verwandten.

Es seien zunächst jene Versuche angeführt, welche Tiere betrafen, die mit irgendeinem Normalserum sensibilisiert und bei denen nachträglich zur Auslösung der anaphylaktischen Giftwirkung Immunsera intravenös eingespritzt worden waren.

# 1. Versuche an mit Normalseren sensibilisierten Tieren.

## a) Aktive Anaphylaxie.

Tabelle XVI.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Vorbehandlung mit	Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
52	483	2 ccm nativem Pferdeserum subkutan	14 Tagen	4 ccm präzipitirendem Pferdekanninchen - Immunserum	unmittelbar nach der Injektion <b>starke</b> Unruhe, Kollaps mit schwerer Dyspnoë; Tier liegt auf der Seite und bleibt unter Parese aller Extremitäten $\frac{3}{4}$ St. wie tot liegen; später erholt sich das Tier
53	23	2 ccm nativem Pferdeserum subkutan	10 „	5 ccm präzipitirendem Pferdekanninchen - Immunserum	im Anschluß an die Injektion schwere Dyspnoë und Parese, nach $\frac{1}{2}$ Stunde etwas erholt; am nächsten Morgen tot im Käfig aufgefunden
54	25	2 ccm nativem Rinderserum subkutan	14 „	5 ccm präzipitirendem Rinderkanninchen - Immunserum	sofort nach der Injektion schwere Dyspnoë, Parese; dann Krämpfe und Tod nach 5 Minuten
55	7	8 ccm eines auf das Vierfache mit Wasser verdünnten und über freier Flamme gekochten Rinderserums	15 „	5 ccm eines präzipitierenden Coccorinderkanninchen-Immunser. 2 Stunden später 3 ccm eines gewöhnlichen präzipitierenden Rinderkanninchen - Immunserums	keine Erscheinungen nach der Injektion sofort typische Symptome; das Tier geht nach 5 Minuten zugrunde
56	62	2 ccm Hundeserum intraperitoneal	25 „	5 ccm schwach präzipitierend. Hundekanninchen - Immunserum 2 Stunden später 5 ccm normales Hundeserum	keine Erscheinungen typische anaphylaktische Erscheinungen

**b) Passive Uebertragung der Anaphylaxie.**

Kaninchen No. 45 wird mit 2 ccm normalen Rinderserums subkutan injiziert, nach 3 Wochen entblutet und das defibrinierte Blut sofort zur Uebertragung verwendet.

Kaninchen No. 87 wird mit 8 ccm eines auf das Vierfache mit Wasser verdünnten und über der Flamme gekochten Rinderserums subkutan injiziert, nach 32 Tagen entblutet und das defibrinierte Blut sofort übertragen.

Kaninchen No. 315 erhält 2 ccm Ziegenserum intraperitoneal; nach 4 Wochen wird das Tier entblutet und das defibrinierte Blut sogleich zur Uebertragung benutzt.

Die mit dem Blute dieser Kaninchen angestellten Uebertragungsversuche ergaben folgendes Resultat:

Tabelle XVII.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Uebertragung durch intraperitoneale Injektion	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
57	169	5 ccm Blut des Kaninchens No. 45 (mit Rinderserum vorbehandelt)	24 Stunden	5 ccm Rinderkaninchen-Immunser.	typische anaphylaktische Erscheinungen, schwere Dyspnoë und Parese; Tier erholt sich
58	33	5 ccm Blut des Kaninchens No. 87 (mit gekochtem Rinderserum vorbehandelt)	48 „	5 ccm Coctoirinderkaninchen-Immunserum	sofort nach der Injektion schwere Dyspnoë und Tod nach wenigen Minuten
59	131	5 ccm Blut des Kaninchens No. 315 (mit Ziegenserum vorbehandelt)	48 „	5 ccm Ziegenkaninchen-Immunser.	schwere Dyspnoë u. leichte Parese; Tier erholt sich

Die angeführten positiven Versuche, denen wir auch mehrere negative, hier nicht näher angeführte anreihen könnten, zeigen, daß sowohl mit nativem als auch mit gekochtem Serumeiweiß sensibilisierte Kaninchen für Kaninchenimmunsere, welche mit den zur Vorbehandlung der Kaninchen benutzten Eiweißkörpern erzeugt worden waren und auf dieselben spezifisch eingestellt sind, äußerst empfindlich sind und unter typischen anaphylaktischen Vergiftungssymptomen

erkranken können, falls ihnen derartige Immunsera beigebracht werden. Dabei hat es sich in unseren Versuchen niemals um frische, sondern stets um durch mehrwöchentliches Stehen bei Zimmertemperatur abgelagerte Immunsera gehandelt, denen an sich, wie zahlreiche Kontrollversuche an Kaninchen gezeigt haben, keinerlei Giftwirkung bei intravenöser Injektion zukam. Daß die Immunsera keine oder durch die Präzipitinreaktion nicht nachweisbare Mengen von körperfremdem Eiweiß enthielten, welche wohl auch kaum ausgereicht hätten, die anaphylaktische Giftwirkung zu erzeugen, wurde bereits früher erwähnt. Es scheint uns demnach aus unseren Versuchen hervorzugehen, daß die Immunsera als solche oder andere in ihnen enthaltene, durch die Präzipitationreaktion nicht nachweisbare Stoffe toxische anaphylaktische Wirkungen bei den sensibilisierten Tieren auszuüben imstande sind; da wir in unseren Versuchen Kaninchen mit Kaninchenimmunserum nachbehandelt haben, so war der Einfluß des körperfremden Eiweißes ausgeschaltet, und wir glauben zur Annahme berechtigt zu sein, daß durch den Immunisierungsprozeß das Blutserum der behandelten Tiere eine derartige Veränderung erfährt, daß es sich normalen, nicht vorbehandelten Tieren gegenüber so verhält, wie ein körperfremdes Eiweiß, das zur Auslösung der anaphylaktischen Vergiftungssymptome geeignet ist. Diese unsere Befunde stehen in Analogie mit Beobachtungen von v. Pirquet und Schick<sup>1)</sup>, welche gefunden haben, daß Kaninchen nach Vorbehandlung mit normalem Pferdeserum auf die allerdings bereits 24 Stunden nachfolgende Injektion von präzipitierendem Antiserum mit lokalem Oedem reagierten, und erinnern auch an die Angaben von Lemaire, nach denen bei Kaninchen, die mit Pferdeeiweiß immunisiert worden waren, die akuten Symptome der Ueberempfindlichkeit gerade dann am stärksten waren,

1) Es möge hier daran erinnert werden, daß v. Pirquet und Schick auf Grund ihrer Versuche bereits 1903 (Zur Theorie der Inkubationszeit. Wiener klin. Wochenschr., 1903, p. 759) die experimentelle Möglichkeit der passiven Uebertragung der „rascheren Reaktionsfähigkeit“ (Ueberempfindlichkeit) aussprechen.

wenn noch Präzipitine im Serum der Tiere vorhanden waren (zitiert nach Otto l. c.).

Auf Grund der vorher mitgeteilten Versuche mußte wohl auch die Möglichkeit in Rücksicht gezogen werden, daß Fälle von Anaphylaxie selbst dann eintreten können, wenn das beigebrachte Immunserum nicht einer artfremden Tierart entstammt, sondern der arteigenen, vorausgesetzt, daß das zur Vorbehandlung der Tierart verwendete Antigen für die Herstellung des zur Nachbehandlung benutzten Immunserums gedient hat oder auf das Immunserum spezifisch eingestellt ist. Wie weit diese theoretisch postulierte Möglichkeit der praktischen Erfahrung nahekommt, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Aus unseren Versuchen scheint uns ferner noch hervorzugehen, daß zwischen der Vorbehandlung der Tiere und der Nachbehandlung, ein sehr inniger Zusammenhang bestehen muß, der sich vor allem darin äußert, daß die zur erfolgreichen Nachbehandlung fähige Substanz auf die zur Vorbehandlung verwendete so abgestimmt sein muß, wie Antigen und Antikörper. Wir ersehen daraus, daß nicht beide (Sensibilisinogen und Antisensibilisin nach Besredka) unbedingt dieselbe Substanz zu sein brauchen, sondern daß es genügt, wenn beide aufeinander spezifisch abgestimmt sind, mögen auch die wirksamen Substrate im chemischen Sinne recht verschieden sein. Trotzdem würde es uns aber ferne liegen, wie noch später ausgeführt werden soll, in allen Fällen von Anaphylaxie auch die Wirkung zweier verschiedener Körper zu postulieren.

## 2. Sensibilisierungsversuche mit Immunseren.

Dieselben Immunsera, mit denen die vorher angeführten Auslösungsversuche an mit normalen Serumeiweißkörpern sensibilisierten Kaninchen angestellt worden sind, versuchten wir zur Sensibilisierung von normalen Kaninchen zu benutzen. Es wurde bereits früher erwähnt, daß diese Immunsera, soweit sie daraufhin geprüft worden waren, kein freies Sensibilisin enthielten und auch zur passiven Uebertragung der Anaphylaxie sich als ungeeignet erwiesen. Zur Nachbehandlung der mit den Immunseren vorbehandelten

Tiere wurden entweder Normalsera oder wiederum Immuns-  
sera verwendet. Ebenso wie bei den früheren Versuchen  
wurde auch hier die Möglichkeit der passiven Uebertragung  
des durch das Immunserum erzeugten Sensibilisins geprüft.  
Der Verlauf der bezüglichen Versuche ergibt sich aus nach-  
stehenden Versuchsprotokollen.

**a) Aktive Anaphylaxie.**

Tabelle XVIII.

Versuchs-No.	Kaninch.-No.	Vorbehandlung mit	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
60	7	2 ccm präzipi- tierendes Rinderkanin- chen-Immuns- serum	19 Tagen	5 ccm Cocto- rinderkanin- chen-Immuns- serum	nach der Injektion Dys- pnoë, dann Parese; nach 1 Stunde Tod unter Krämpfen
61	8	wie oben	14 „	5 ccm Ziegen- kaninchen- Immunserum	keine Erscheinungen
62	10	2 ccm präzipi- tierendes Cocto- rinderkanin- chen-Immuns- serum	17 „	5 ccm Cocto- rinderkanin- chen-Immuns- serum	unmittelbar nach der In- jektion Dyspnoë, Tier macht einen schwer kranken Eindruck; er- holt sich nach 1 1/2 Stun- den
62a	10	wie oben	18 „	5 ccm desselben Serums	sofort nach der Injektion schwere Dyspnoë, Un- ruhe, Tier legt sich auf die Seite und geht nach einigen Minuten zugrunde

**b) Passive Anaphylaxie.**

Zu diesem Behufe wurden einige Kaninchen intra-  
peritoneal mit Immunserum vorbehandelt und zwar erhielt  
Kaninchen No. 35 2 ccm Hundeimmunserum, Kaninchen  
No. 19 2 ccm Ziegenimmunserum und Kaninchen No. 58  
2 ccm Katzenimmunserum intraperitoneal; Kaninchen No. 35  
wurde nach 33 Tagen, Kaninchen No. 19 nach 20 Tagen und  
Kaninchen No. 58 nach 21 Tagen entblutet und das de-  
fibrinierte Blut à 5 ccm mittels intraperitonealer Injektion  
auf normale Kaninchen übertragen. Die Versuche verliefen  
folgendermaßen:



Tabelle XIX.

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Uebertragung durch intra-peritoneale Injektion von	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
63	175	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 35 (vorbehandelt mit Hundeeimmunserum)	48 Stdn.	5 ccm Hundeeimmunserum	Tier nach der Injektion schwer dyspnoisch; später leichte Parese, dann Collaps; Tier legt sich auf die Seite und geht nach $\frac{1}{2}$ Stunde zugrunde
64	178	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 35 (vorbehandelt mit Hundeeimmunserum)	48 „	5 ccm normalen Hundeserums	leichte Dyspnoë; Tier macht einen kranken Eindruck, erholt sich jedoch nach 1 Stunde
65	53	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 19 (vorbehandelt mit Ziegenimmunserum)	24 „	5 ccm normalen Ziegenserum	keine Erscheinungen
66	131	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 19 (vorbehandelt mit Ziegenimmunserum)	24 „	6 ccm Ziegenkaninchenimmunserum	zunächst keine Erscheinungen; am nächsten Morgen tot aufgefunden
67	30	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 19 (vorbehandelt mit Ziegenimmunserum)	24 „	6 ccm Ziegenkaninchenimmunserum	unmittelbar nach der Injektion keine Erscheinungen; $\frac{1}{4}$ Stunde später schwere Dyspnoë und Tod nach 1 Stunde
68	298	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 19 (vorbehandelt mit Ziegenimmunserum)	24 „	6 ccm Ziegenkaninchenimmunserum	unmittelbar nach der Injektion einsetzende schwere Dyspnoë; später erholt sich das Tier
69	160	5 ccm defibrinirten Blutes des Kaninchens No. 58 (vorbehandelt mit Katzenimmunserum)	3 Tagen	5 ccm normalen Katzenserums	Dyspnoë; nur leichte Krankheitserscheinungen

Versuchs-No.	Kaninchen No.	Uebertragung durch intraperitoneale Injektion von	Intravenöse Nachbehandlung		Versuchsergebnis
			nach	mit	
70	17	5 ccm defibrinierten Blutes des Kaninchens No. 58 (vorbehandelt mit Katzenimmunserum)	3 Tagen	5 ccm Katzenkaninchenimmunserum	schwerste Dyspnoë und Parese aller Extremitäten; typische Anaphylaxie; Tier erholt sich
71	84	5 ccm defibrinierten Blutes des Kaninchens No. 58 (vorbehandelt mit Katzenimmunserum)	3 „	5 ccm Katzenkaninchenimmunserum	sofort nach der Injektion ist das Tier gelähmt und schwer dyspnoisch; es legt sich auf die Seite u. bleibt wie tot liegen; nach $\frac{1}{2}$ Stunde erholt sich das Tier wieder völlig
72	56 Kontrolltier	—	—	5 ccm Katzenkaninchenimmunserum	keine Erscheinungen

Die angeführten Versuche zeigen, daß es gelingt, Tiere mit den verwendeten Immunseren zu sensibilisieren, resp. durch diese Immunsera den sogenannten „anaphylaktischen Reaktionskörper“ zu erzeugen, so daß eine nachträgliche Behandlung der Versuchstiere mit dem gleichartigen Immunserum den typischen anaphylaktischen Vergiftungskomplex auslöst. Ebenso gelingt es, den durch Immunsera erzeugten Reaktionskörper mit dem Blute auf normale Tiere zu übertragen und auf diese Weise an normalen Tieren durch nachträgliche Immunseruminjektion Anaphylaxie auszulösen. Man findet ferner bei Durchsicht der Versuchsprotokolle, daß gerade die Nachbehandlung mit Normalseren bei den mit Immunseren sensibilisierten Tieren nur leichte anaphylaktische Erscheinungen auslöste, während die in gleicher Weise vorbehandelten Tiere bei Nachbehandlung mit Immunseren viel prägnantere anaphylaktische Vergiftungssymptome darboten. Wenn auch die Zahl der diesbezüglichen Versuche eine zu kleine ist, um weitgehende Schlüsse zu rechtfertigen, so können sie immerhin als Stütze für die Anschauung herangezogen werden, daß die Sensibilisierung nicht auf Kosten der den

Immunseren beigemengten Spuren artfremden Eiweißes stattgefunden haben konnte, da in diesem Falle gerade bei der Nachbehandlung mit Normalseren die prägnantere Reaktion zu erwarten wäre. Noch ein anderer Umstand verdient besondere Beachtung. Die gelungene Sensibilisierung durch Immunsera könnte, wiewohl bereits erwähnt wurde, daß in vielen dieser Sera ein freier anaphylaktischer Reaktionskörper nicht nachzuweisen war, immerhin den Anschein erwecken, daß es sich einfach um passive Uebertragung der Anaphylaxie durch die betreffenden Immunsera gehandelt habe; gegen diese Anschauung spricht der Umstand, daß die durch die Vorbehandlung mit Immunserum erzeugte Anaphylaxie sich in exquisiter Weise passiv auf normale Tiere übertragen läßt, so daß uns die Annahme gerechtfertigt scheint, daß es sich bei den mit Hilfe der Immunsera sensibilisierten Tieren um die aktive Erzeugung des anaphylaktischen Zustandes handelt. Diese Deutung, welche wir für unsere Versuche in Anspruch nehmen, dürfte wohl auch für manche jener Phänomene die richtige sein, welche von den Autoren unter den Begriff der „passiven“ Uebertragung eingereiht werden; diese unsere Versuchsergebnisse sind auch gleichzeitig geeignet, die Ansicht von Gay und Southard zu stützen, welche auch in den von ihnen ausgeführten Uebertragungsversuchen der Anaphylaxie durch das Blutserum überempfindlicher Tiere auf normale Tiere einen aktiven Prozeß erblicken; inwieweit jedoch die Ansicht dieser Autoren, daß es sich dabei um „nicht neutralisierte Reste“ des Pferdeserums (Anaphylaktine) handle, zu Recht besteht, muß offen gelassen werden. Unsere Versuche geben endlich auch eine Erklärung für das Mißlingen von Experimenten, welche verschiedene Autoren, wie Rosenau und Anderson, Otto und Besredka in der Absicht ausgeführt haben, durch Neutralisieren des Normalserums mit Immunserum oder durch Vorbehandlung mit Immunserum die toxischen und anaphylaktisierenden Wirkungen einer nachfolgenden Seruminjektion aufzuheben; da die Immunsera an sich sowohl eine sensibilisierende als auch eine toxische anaphylaktische Wirkung besitzen, kann von deren Applikation kein Schutz gegen die Anaphylaxie erwartet werden.

**Zusammenfassung.**

Ueberblickt man die in den hier durchgeführten Untersuchungen erzielten Versuchsergebnisse, so ergibt sich, daß die verschiedenartigsten Eiweißderivate und Eiweißfraktionen des Serums imstande sind, sowohl die sensibilisierende als auch die toxische Wirkung bei sensibilisierten Tieren zu entfalten. Die wichtigsten der von uns erhaltenen Versuchsergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt, die zunächst eine Uebersicht bieten soll über jene Substanzen, welche zur Sensibilisierung resp. zur Auslösung der anaphylaktisch toxischen Erscheinungen an sensibilisierten Tieren befähigt sind; da nahezu alle Versuchsergebnisse sowohl durch die aktive, wie auch durch die passive Auslösung der Anaphylaxie gewonnen worden sind, ist in der Tabelle auf die Art der Auslösung des Phänomens keine weitere Rücksicht genommen.

Uebersichtstabelle.

No. der Tabelle und des Versuches	Das verwendete Eiweißderivat	Wirksam als Sensibilisinogen	Wirksam als toxische Substanz	Versuchsergebnis
Tab. I Vers.-No. 2	1/-stünd. Pepsin-HCl-Verdauung des nativen Rinderserums	Pepsin-HCl-Verdauungslösung	dieselbe Pepsin-Salzsäure-Verdauungslösung	positiv
Vers.-No. 5 u. 6	dasselbe	dasselbe	normales Rinderserum	„
Tab. III Vers.-No. 8 u. 9	gekochte 10-proz. Wittepeptonlösung	Wittepeptonlösung	Wittepeptonlösung	„
Tab. II Vers.-No. 7	dasselbe	normales Rinderserum	dasselbe	„
Tab. IV Vers.-No. 11 u. 15	4-tägige Trypsin-Soda-Verdauung des koagulierten Rinderserums	Trypsinverdauungslösung	normales Rinderserum	„
Tab. IV u. V Vers.-No. 11, 13 u. 14	dasselbe	dasselbe	Trypsinverdauungslösung	negativ
Vers.-No. 16	dasselbe	dasselbe	10-proz. Wittepeptonlösung	„
Vers.-No. 12	dasselbe	normales Rinderserum	Trypsinverdauungslösung	„

No. der Tabelle und des Versuchs	Das verwendete Eiweißderivat	Wirksam als Sensibilisinogen	Wirksam als toxische Substanz	Versuchsergebnis
<b>Tab. VI</b> Vers.-No. 20 u. 25	nitriertes Rinder-serumeiweiß	nitriertes Rinder-serumeiweiß	nitriertes Rinder-serumeiweiß	positiv
<b>Tab. VI—VIII</b> Vers.-No. 21 u. 22	dasselbe	dasselbe	normales Rinder-serumeiweiß	„
Vers.-No. 18	dasselbe	dasselbe	nitriertes Kanin-chenserum-eiweiß	negativ
Vers.-No. 24	dasselbe	dasselbe	jodiertes Rinder-serumeiweiß	„
<b>Tab. IX u. X</b> Vers.-No. 28 u. 29	jodiertes Rinder-serumeiweiß	jodiertes Rinder-serumeiweiß	dasselbe	positiv
Vers.-No. 32	dasselbe	dasselbe	natives Rinder-serum	„
Vers.-No. 33	dasselbe	dasselbe	nitriertes Rinder-serumeiweiß	negativ
Vers.-No. 34	dasselbe	dasselbe	Wittepepton	„
<b>Tab. XII u. XIII</b> Vers.-No. 38, 39 u. 40	Pferdeserum-lipoide	Pferdeserum-lipoide	Pferdeserum-lipoide	positiv
Vers.-No. 42	Rinderserum-lipoide	Rinderserum-lipoide	normales Rinder-serum	„
Vers.-No. 44	Rinderserum-lipoide	Rinderserum-lipoide	Rinderserum-lipoide	positiv
<b>Tab. XIV</b> Vers.-No. 47	Euglobulin und Pseudoglobulin des Rinder- und Pferdeserums	Pseudoglobulin des Rinder-serums	Euglobulin des Rinderserums	„
Vers.-No. 48	dasselbe	Pseudoglobulin des Pferdeser.	Euglobulin des Pferdeserums	„
<b>Tab. XVI u. XVII</b> Vers.-No. 52 u. 53	Pferdekaninch.-Immunserum	normales Pferde-serum	Pferdekaninch.-Immunserum	„
Vers.-No. 54, 55, 57 u. 58	Rinderkaninch.-Immunserum	normales u. gekochtes Rinder-serum	Rinderkaninch.-Immunserum	„
Vers.-No. 59	Ziegenkaninch.-Immunserum	normales Ziegen-serum	Ziegenkaninch.-Immunserum	„
<b>Tab. XVIII u. XIX</b> Vers.-No. 60 u. 62	Rinderkaninch.-Immunserum	Rinderkaninch.-Immunserum	Rinderkaninch.-Immunserum	„
Vers.-No. 63	Hundekaninch.-Immunserum	Hundekaninch.-Immunserum	Hundekaninch.-Immunserum	„
Vers.-No. 64	dasselbe	dasselbe	normales Hundeserum	leichte Erscheinungen
Vers.-No. 67 u. 68	Ziegenkaninch.-Immunserum	Ziegenkaninch.-Immunserum	Ziegenkaninch.-Immunserum	positiv

No. der Tabelle und des Versuchs	Das verwendete Eiweißderivat	Wirksam als Sensibilisinogen	Wirksam als toxische Substanz	Versuchs- ergebnis
Tab. XVIII u. XIX				
Vers.-No. 65	Ziegenkaninch.- Immunserum	Ziegenkaninch.- Immunserum	normales Ziegen- serum	negativ
Vers.-No. 70 u. 71	Katzenkaninch.- Immunserum	Katzenkaninch.- Immunserum	Katzenkaninch.- Immunserum	positiv
Vers.-No. 69	dasselbe	dasselbe	normales Katzen- serum	leichte Erschei- nungen

Man ersieht zunächst, daß die Widerstandsfähigkeit sowohl der sensibilisierenden, wie auch der toxischen Substanz nicht allein, wie schon Besredka bezüglich der sensibilisierenden Substanz gezeigt hatte, gegen Erhitzen, sondern auch gegen schwere chemische Eingriffe, wie die Behandlung mit konzentrierter Salpetersäure beim Nitrierungsprozeß, die mit Spaltungs- und Oxydationsprozessen einhergehende Jodierung, ferner die Pepsin- und Trypsinverdauung eine sehr große, wenn auch nicht unbegrenzte ist. Denn es muß immerhin auffällig bleiben, daß sowohl bei den mit der Trypsinverdauungslösung des koagulierten Rindereiweißes, als auch bei den Xanthoprotein- und Jodderivaten unter sehr zahlreichen Versuchen nur einige wenige ein positives Ergebnis hatten und daß wir keinen einzigen positiven Versuch zu verzeichnen hatten, als wir die Trypsinverdauungslösung zur Nachbehandlung der sensibilisierten Tiere zu verwenden suchten. Es müssen daher die wirksamen Bestandteile durch die betreffenden Spaltungsprozesse eine bedeutende Abschwächung erfahren haben, wenn auch nicht eine völlige Zerstörung, da in einigen Fällen ein ganz charakteristischer und typischer Vergiftungskomplex zu erzielen war. Dabei bleibt es bemerkenswert, daß zwischen der sensibilisierenden und der toxischen Wirkung der betreffenden Eiweißderivate kein wesentlicher Unterschied besteht, so daß uns die Annahme gerechtfertigt scheint, daß auch die toxische Substanz eine sowohl gegen Erhitzen, wie auch gegen chemische Eingriffe äußerst resistente ist. Auch

Rosenau und Anderson geben an, daß die Erwärmung auf  $60^{\circ}$  das Serum keineswegs seiner Giftigkeit beraube, sondern daß dazu erst eine 25 Minuten lange Erhitzung auf  $100^{\circ}$  nötig sei; Besredka dagegen findet die toxischen Wirkungen des Pferdeserums bereits durch wiederholtes Erwärmen auf  $60^{\circ}$  bedeutend herabgesetzt und bei  $100^{\circ}$  völlig erloschen im Gegensatz zu den sensibilisierenden Wirkungen des Serums, die sich als thermostabil erwiesen. Unsere nicht am nativen Eiweiß, sondern an Eiweißspaltungsprodukten, wie z. B. am Wittepepton, durchgeführten Erhitzungsversuche ergeben keinen Unterschied zwischen sensibilisierender und toxischer Wirkung der Derivate und es erscheint uns daher nicht unmöglich, daß die von Besredka beobachteten Differenzen weniger einen prinzipiellen, als nur einen quantitativen Unterschied zwischen den beiden Substraten ausdrücken. Da auch nicht mittels der Alkoholbehandlung, wie Vaughan und Wheeler glauben, noch mittels der fraktionierten Fällung mit Ammonsulfat, wie Gay und Adler angeben, eine Trennung der sensibilisierenden und toxischen Wirkung erzielt werden konnte, so scheint es uns vorläufig nicht genügend begründet zu sein, in allen Fällen, in denen der anaphylaktische Symptomenkomplex ausgelöst worden ist, auch die Wirkung zweier verschiedener Substanzen im Serum anzunehmen. Daß in manchen Fällen jedoch durch die Mitwirkung zweier verschiedener Substanzen, die allerdings aufeinander scharf spezifisch eingestellt sind, das anaphylaktische Vergiftungsbild ausgelöst wird, zeigen sehr deutlich unsere Versuche, in denen es gelungen ist, durch Nachbehandlung mit Immunserum, das spezifisch eingestellt war auf ein zur Vorbehandlung verwendetes Normalserum, typische Anaphylaxie zu erzeugen. Dieses so erzeugte Phänomen gibt auch einen Hinweis auf den möglicherweise bestehenden Mechanismus der Auslösung der Giftwirkungen; denn wie das Kaninchenimmunserum auf ein beliebiges Normalserum, mit dem es erzeugt wurde, spezifisch eingestellt ist, so dürften wohl auch dort, wo ein und dasselbe Normalserum die sensibilisierende und toxische Wirkung gleichzeitig auslöst, beide Komponenten miteinander ebenfalls in sehr nahen biologischen Beziehungen stehen, wenn

sie nicht überhaupt, was uns für viele Fälle am wahrscheinlichsten scheint, miteinander identisch sind.

Ueber die Natur der wirksamen Körper können die ausgeführten Untersuchungen keinen direkten Aufschluß geben. Es läßt sich nur aus der relativ hohen Widerstandsfähigkeit der an der Reaktion beteiligten Körpersysteme der Nachweis erbringen, daß diese Substanzen mit einer Reihe der bekannten, im Serum befindlichen thermolabilen Gifte nicht identifiziert werden können, wie das schon aus Besredkas Befunden über die Thermostabilität des Sensibilisinogens und aus den am Aalserum durchgeführten, äußerst gründlichen Untersuchungen Doerr's und Raubitschek's hervorgeht.

Wir haben bei unseren Anaphylaxieversuchen gesehen, daß die besten und sichersten Resultate zu erzielen waren, wenn die Tiere mit nativen, ungespaltenen Eiweißkörpern vor- und nachbehandelt worden waren; in dem Maße als die Eiweißkörper aufgespalten wurden, sei es durch Pepsin-HCl, wie beim Wittepepton, sei es durch die Trypsinverdauung, nahm die Zahl der positiven Resultate ab, ohne indessen vollkommen zu verschwinden; in ähnlicher Weise verhielten sich auch die bei Anwendung des nitrierten und jodierten Eiweißes erzielten Versuchsergebnisse. Andererseits zeigen die, wenn auch spärlichen positiven Versuche mit den alkohollöslichen Serumlipoiden, daß auch eiweißarmen kolloidalen Komplexen die Fähigkeit zukommt, sowohl zu sensibilisieren, als auch toxisch anaphylaktisch zu wirken. Es scheint uns, daß diese verschiedenen Tatsachen am leichtesten vereinigt werden können in der Vorstellung, daß es sich keineswegs um eine chemisch zu charakterisierende einheitliche Substanz in allen diesen Fällen handeln könne, sondern um die Wirkung von größeren kolloidalen Komplexen, welche der Zerlegung durch proteolytische Fermente, durch Nitrierung und Jodierung zugänglich, höchstwahrscheinlich eiweißartiger Natur sind, aber unter Umständen auch kolloidale Eiweiß-Fettverbindungen sein können. Um ähnliche kolloidale großmolekulare Verbindungen dürfte es sich auch bei den von Richet verwendeten Körpern handeln, ohne daß irgendein im chemischen Sinne einheitliches Gift als die Ursache der charakteristischen Giftwirkung anzusehen wäre.



Wir sind bei unseren Untersuchungen von der Frage ausgegangen, ob bei den Erscheinungen der Anaphylaxie die Zustandsspezifität die gleiche Rolle spielt, wie bei den Präzipitationsphänomenen. Vergleicht man die bei der Anaphylaxie erzielten Versuchsergebnisse mit den analogen von Obermayer und Pick bei den Präzipitationsphänomenen angestellten Experimenten, so ergibt sich bereits bei Durchsicht der in der letzten Tabelle zusammengestellten Versuche, daß von einer scharfen Ausprägung der Zustandsspezifität kaum die Rede sein kann. Wohl zeigt sich, daß manche Derivate, wie z. B. nitriertes Rinderserum bei Vorbehandlung mit jodiertem Rindereiweiß keine Anaphylaxie auszulösen vermögen; doch kann aus dem negativen Ausfall derartiger Versuche um so weniger ein Schluß gezogen werden, als vielfach gerade mit diesen Derivaten auch bei gleichartiger Vor- und Nachbehandlung die Auslösung der typischen Erscheinungen nicht gelang. Wir sehen, daß wir nicht allein bei Nachbehandlung mit demselben Derivate, welches zur Vorbehandlung benützt wurde, Anaphylaxie auslösen können, sondern auch regelmäßig, häufig sogar viel prompter, mit nativem Serum; ja selbst Tiere, welche mit nitriertem und jodiertem Serum-eiweiß vorbehandelt worden waren, wurden von typischen anaphylaktischen Erscheinungen nach Injektion von nativem Serum derselben Tierart befallen. Dieser Mangel der Empfindlichkeit gegenüber der viel spezifischer verlaufenden Präzipitinreaktion deutet unseres Erachtens schon dahin, daß beide Prozesse im Tierkörper voneinander unabhängig verlaufen; daß die Anaphylaxie und die Präzipitation voneinander zu trennen sind, geht schon aus dem von uns erhobenen Befunde hervor, daß Pepsinverdauungsprodukte, welche weder präzipitiert werden können, noch Präzipitine im Tierkörper zu erzeugen vermögen, sowohl sensibilisierend wie auch toxisch zu wirken imstande sind; doch scheint uns vorläufig auf Grund dieses Befundes die Annahme, daß die kolloidalen Komplexe, welche die beiden Reaktionen im Tierkörper auslösen, voneinander völlig verschieden sein müssen, nicht eine unbedingt zwingende zu sein. Es liegt im Wesen der Anaphylaxiereaktion, daß feinere Unterschiede, wie sie bei der Präzipitinreaktion zum Ausdruck kommen, sich hier nicht so deutlich ausprägen

können. Da es sich bei der Anaphylaxie scheinbar um eine bestimmte Ueberempfindlichkeit im Gebiete des Nervensystems handelt, wird jeder adäquate Reiz eine Wirkung ausüben, wobei die feineren Unterschiede, wie sie eben die Zustandsspezifität schafft, in dem schweren Vergiftungsbilde nicht zur Geltung kommen. Konnte doch sogar Heilner Kaninchen, die mit großen Dosen Pferdeserums vorbehandelt und so überempfindlich gemacht worden waren, in gleicher Weise töten, wenn er sie statt mit Pferdeserum mit einer hypertonen 4-proz. NaCl-Lösung nach 1—3 Monaten wieder injizierte und zwar in Dosen, welche die Kontrolltiere sehr wohl vertrugen. Wenn auch diese Beobachtung wohl nicht der spezifischen Anaphylaxie gleichgestellt werden darf, so zeigt sie immerhin, welch große Vorsicht bei der Bewertung des anaphylaktischen Symptomenkomplexes nötig ist. Es möge auch hier daran erinnert werden, daß wir zu wiederholten Malen der Anaphylaxie ähnliche Erscheinungen beobachtet haben, als wir eine relativ geringe Menge (5 ccm pro 700—800 g schwere Kaninchen) frisch defibrinierten Kaninchenbluts Kaninchen intravenös einführten, ein Phänomen, welches in Analogie steht mit den neueren Befunden von Gottlieb und Lefmann, welche nach intravenöser Injektion von Lipoidsubstanzen aus artfremden, zuweilen jedoch auch aus arteigenen roten Blutkörperchen ein schweres durch Blutdrucksenkung, Atmungs- und Pulsbeschleunigung, Erscheinungen von Lähmung und Narkose gekennzeichnetes Vergiftungsbild beobachteten. Nach unseren Ergebnissen ist es kaum zu erwarten, daß die anaphylaktische Reaktion die ungemein empfindliche, jede physikalische und chemische Veränderung des Eiweißes wiedergebende Präzipitinreaktion wird ersetzen können; da jedoch die Anaphylaxie scheinbar ganz andere Organsysteme zu beeinflussen imstande ist als die anderen Immunreaktionen, so ist die Möglichkeit gegeben, diese ungemein merkwürdige Reaktion des Organismus in anderer Weise als die bisher bekannten Immunreaktionen für die Physiologie und Pathologie nutzbar zu machen.

Wien, November 1908.

### Literatur.

Ausführliche Literaturangaben finden sich in den Referaten von Doerr, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 13; von Otto im Handbuch der pathogenen Mikroorgan. von Kolle u. Wassermann, 2. Erg.-Bd., Heft 2, 1908, p. 231, und von C. Levaditi im Jahresber. über die Ergebnisse der Immunitätsforschung von W. Weichardt, Bd. 3, 1908.

Ascoli, M., Ueber den Mechanismus der Albuminurie durch Eiereiweiß. Münch. med. Wochenschr., 1902, No. 10.

Besredka, Du mécanisme de l'anaphylaxie vis-a-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 22, p. 496; ferner Compt. rend. Soc. biol., Octobre 1907 und Mai 1908, T. 64.

Besredka et Steinhardt, De l'anaphylaxie et de l'antianaphylaxie vis-a-vis du sérum de cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 21, 1907, p. 117 und p. 384.

Doerr und Raubitschek, Toxin und anaphylaktisierende Substanz des Aalserums. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 33.

Friedemann, M., Ueber passive Ueberempfindlichkeit. Münch. med. Wochenschr., 1907.

Gay and Adler, On the chemical separation of the sensitizing fraction (anaphylactin) from horse serum. Journ. of med. res., Vol. 18, June 1908.

Gay and Southard, Further studies in anaphylaxis. Journ. of med. Res., Vol. 18, No. 3; Vol. 19, No. 1, June, Juli 1908.

Gibson, R. B., Journ. biolog. Chemistry, Vol. 1, 1906, No. 2 u. 3.

Gley, Compt. rend. Soc. biol., T. 48, 1896, p. 658.

Gottlieb und Lefmann, Ueber die Giftstoffe des artfremden Blutes. Mediz. Klinik, 1907, No. 15. — G. Lefmann, Zur Kenntnis der Giftsubstanzen des artfremden Blutes. Hofmeisters Beitr., Bd. 11, 1908, p. 255.

Heilner, Ueber die Wirkung künstlich erzeugter physik. (osmot.) Vorgänge im Tierkörper etc. und Ueber die Wirkung großer Mengen artfremden Blutserums etc. Zeitschr. f. Biol., Bd. 50, 1907; ferner Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 49.

Kraus und Doerr, Ueber Bakterienanaphylaxie. Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 28.

Kraus, Doerr und Sohma, Ueber Anaphylaxie, hervorgerufen durch Organextrakte (Linsen). Ebenda, 1908, No. 30.

Lemaire, H., Rech. clin. et expérim. sur les accid. sérotoxiques. Thèse de Paris, 1906.

Levaditi et Mutermilch, Comptes rend. Soc. biol., 1908.

Levis, The induced susceptibility of the guinea-pig to the toxic action of the blood serum of the horse. Journ. of exper. Medic., 1908, X, 1.

Michaelis, L., Weitere Untersuchungen über Eiweißpräzipitine. Deutsche med. Wochenschr., 1904, No. 34. und Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 56, 1905.

- Nicolle, M., et Abt, G., Les anticorps des albuminoïdes et des cellules. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 22, 1908, p. 132.
- Obermayer und Pick, Ueber die chemischen Grundlagen der Arteigenschaft der Eiweißkörper. Wiener klin. Wochenschr., 1906, p. 327.
- Otto, Das Theobald-Smithsche Phänomen der Serumüberempfindlichkeit. v. Leuthold-Gedenkschrift, 1906, Bd. 1. — Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit. Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 37.
- Pesaro, Lo Sperimentale, Vol. 56, 1902, Fasc. 3.
- Pick und Pribram, E., Beiträge zur Kenntnis ätherempfindlicher und ätherlöslicher Substanzen des Blutserums und Einfluß auf einige Immunitätsreaktionen. Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, Heft 5 u. 6.
- Pick und Schwarz, O., Ueber die Beeinflussung der Antigenwirkung durch Lecithin und Organlipide und deren Beteiligung am Immunisierungsprozeß. Ibid., 1909.
- Pick und Yamanouchi, Studien über Anaphylaxie. Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 44.
- Pirquet, v., Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie. Leipzig und Wien (Deuticke) 1907.
- Pirquet, v., und Schick, B., Die Serumkrankheit. Leipzig und Wien (Deuticke) 1905.
- Portier et Richet, Compt. rend. Soc. biol., 1902, p. 170.
- Richet, Ch., De l'anaphylaxie en général et de l'anaphylaxie par la mytilo-congestine en particulier. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 21, 1907, p. 497, und Compt. rend. de la Soc. biol., T. 62, 1907, V, p. 643.
- Richet, Ch., De l'anaphylaxie et des toxogénines. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 22, 1908, p. 465.
- Rosenau and Anderson, A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Hygienic Laboratory, Bulletin No. 29, April 1906, Washington.
- Dieselben, Studies upon hypersusceptibility and immunity. Ibid., Bulletin No. 36, April 1907. — The specific nature of anaphylaxis. Journ. infect. Diseases, Vol. 4, 1907, p. 552.
- Uhlenhuth, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von Menschen- und Tierblut etc. Jena (G. Fischer) 1905.
- Vaughan and Wheeler, The effects of egg-white and its split products on animals. Journ. infect. Diseases, Vol. 4, 1907, p. 476.
- Yamanouchi, T., Ueber die Anwendung der Anaphylaxie zu diagnostischen Zwecken. Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 47.

[Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

### **Zur Frage der Serumanaphylaxie.**

Von Prof. **R. Kraus** und Dr. **R. Volk**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 8. Februar 1909.)

Besredka hat jüngst<sup>1)</sup> feststellen können, daß die Auslösung der anaphylaktischen Erscheinungen bei mit Serum vorbehandelten Tieren durch einen anderen Körper bedingt sein muß als die Erzeugung der Anaphylaxie selbst. Er weist nach, daß dieser letztere thermostabil ist und selbst durch Erhitzung auf 100° nicht geschädigt wird. Die mit erhitztem Serum vorbehandelten Meerschweinchen können nach Injektion von nicht erhitztem Serum typische Anaphylaxieerscheinungen darbieten. Diesen thermostabilen Körper, welcher antigen wirkt, nennt Besredka Sensibilisinogen.

Erhitzt man aber ein vierfach mit destilliertem Wasser verdünntes Serum durch 10 Minuten auf 100°, so beraubt man es dadurch der Eigenschaft, bei vorbehandelten Tieren Anaphylaxieerscheinungen auszulösen. Diesen weniger thermostabilen Körper, der bei der Injektion toxisch wirkt, nennt Besredka Antisensibilisin.

Wenn es auch durch diese Versuche wahrscheinlich gemacht war, daß der Mechanismus der Anaphylaxie in der von Besredka beschriebenen Weise zustande kommen dürfte, so ist der absolute Beweis in seinen Versuchen nicht gegeben. Es war immerhin möglich, daß Tiere, die mit nicht erhitztem Serum vorbehandelt sind, auf erhitztes Serum nicht reagieren, während mit erhitztem Serum vorbehandelte Tiere sich anders verhielten. Die bekannten Versuche von Obermayer und Pick haben ja gelehrt, daß erhitztes Serum anders antigen wirkt als nicht erhitztes. — Erst wenn diese

---

1) Annales de l'Inst. Pasteur, 1908.

Lücke ausgefüllt war und auch gezeigt werden konnte, daß bei passiv anaphylaktisierten Tieren erhitztes Serum bei der zweiten Injektion unwirksam ist, waren vollgültige Beweise für die Verschiedenheit der beiden Körper im normalen Serum gegeben.

Unsere Versuche, welche in Tabelle I zusammengestellt sind, lehren zunächst, daß Tiere, welche mit geringen Mengen normalen Pferdeserums vorbehandelt sind, nach Injektion von erhitztem Serum keine Erscheinungen von Anaphylaxie dar-

Tabelle I.

Mit nicht erhitztem Pferdeserum vorbehandelte Meerschweinchen	Reinjiziert mit erhitztem Serum (3-fach verdünnt auf 100° oder mit Harnstoff), intravenös	Resultat	Nach 15' reinjiziert mit nicht erhitztem Serum, intravenös	Resultat
M. 346	1,0	keine Erscheinung	1,0 <sup>1)</sup>	sofort Erscheinungen; + 5'
596	1,0 nach 15' nochmals 1,0 erhitztes Serum (verdünnt mit Harnstofflösung)	dgl. dgl.	—	—
219	1,0 nach 15' nochmals 1,0 erhitztes Serum (verdünnt mit Harnstofflösung)	dgl. dgl.	1,0	sofort Erscheinung; + 5'
22	1,0 erhitzt, verdünnt mit Harnstofflösung	dgl.	1,0	sofort Erscheinung; + 5'

bieten, wohl aber, wenn man ihnen nicht erhitztes Serum nachinjiziert. Durch diese Versuche konnten wir zunächst die von Besredka gefundenen Tatsachen bestätigen.

Im Gegensatz zu erhitztem Serum, welches durch vierfache Verdünnung mit destilliertem Wasser oder durch Zusatz

1) Die vorbehandelten Meerschweinchen gehen in der Regel mit 0,2 nicht erhitztem, intravenös injiziertem Serum sicher zugrunde.

von Harnstofflösung inkoagulabel gemacht worden war und nach Erhitzung auf 100° sich inaktiv verhält, konnten wir mit auf 100° erhitztem festem Serum, welches dann aufgelöst wurde, ebenso typische Erscheinungen auslösen wie mit nicht erhitztem Serum (Tabelle II). Diese Tatsache und noch der

Tabelle II.

Mit nicht erhitztem Pferdeserum vor- behandelte Meer- schweinchen	Reinjiziert mit 20' auf 100° erhitztem Trocken- serum, intravenös	Resultat
696	1,0	sofort Erscheinung; + 5'
605	1,0	dgl.
346	1,0	dgl.
29	1,0	dgl.
679	1,0	dgl.
22	1,0	dgl.
483	1,0	dgl.

folgende Befund, daß ein festes Serum, erhitzt auf 134°, sich ebenso verhält, wie erhitztes flüssiges Serum (Tabelle III), scheint dafür zu sprechen, daß das Antisensibilisin Besredkas an die Eiweißkörper des Serums gebunden sein

Tabelle III.

Mit nicht erhitztem Serum vor- behandelte Meer- schweinchen	Reinjiziert mit auf 130° erhitz- tem Trocken- serum (2 Atm.) 8' intravenös	Resultat	Reinjiziert mit 20' auf 100° er- hitztem Trocken- serum, nach 15' intravenös	Resultat
429	1,0	keine Er- scheinung	1,0	sofort Er- scheinung; + 5'
699	1,0	dgl.	1,0	dgl.
483	1,0	dgl.	1,0	dgl.
504	1,0	dgl.	1,0	dgl.

dürfte und mit deren Denaturierung zugrunde geht. Diese Versuche bilden eine Analogie zu den bekannten Angaben über die Natur der Agglutinine und Präzipitine, in welchen ebenfalls gezeigt werden konnte, daß das feste Serum höhere Temperaturen verträgt, ohne daß die Antikörper geschädigt

werden, als flüssiges. — Erst bei 130—140°, bei welchen Temperaturen erfahrungsgemäß die Eiweißkörper auch im festen Zustande denaturiert werden, gehen die Antikörper auch zugrunde.

Im nächsten Versuche läßt sich zeigen, daß Meerschweinchen, welche mit auf 90° durch  $\frac{1}{4}$  Stunde erhitztem Serum vorbehandelt sind, ebenso auf erhitztes flüssiges Serum nicht reagieren wie die mit nicht erhitztem Serum vorbehandelten. Durch nicht erhitztes Serum kann man, wie schon Besredka gezeigt hat, bei diesen Tieren typische anaphylaktische Symptome auslösen.

Tabelle IV.

Mit erhitztem ( $\frac{3}{4}$ Stunden auf 90°) Pferdeserum 0,1 vorbe- handelte Meerschwein- chen	Reinjiziert mit erhitztem Serum intravenös	Resultat	Nach 20 Minuten reinjiziert mit nicht erhitztem Serum	Resultat
746	2,0 (90° erhitztes Serum)	keine Er- scheinung	1,0	Erscheinung; + nach einigen Stunden
748	1,0	dgl.	1,0	sofort Erscheinung + 15'
714	2,0	dgl.	1,0	sofort Erscheinung; + 1 Std.

Damit ist wohl festgestellt, daß erhitztes Serum imstande ist, antigen zu wirken, das Sensibilisin nach Besredka hervorzurufen, nicht aber imstande ist, bei vorbehandelten Tieren Erscheinungen auszulösen. — Durch diese Versuche ist auch der Einwand, der Besredkas Versuchen hätte gemacht werden können, ausgeschaltet und eine weitere Stütze für die von Besredka aufgestellte Theorie erbracht.

Und auch die in Tabelle V verzeichneten Versuche, in welchen es uns gelungen ist, bei passiv anaphylaktisierten Tieren nur mit nicht erhitztem Serum Erscheinungen auszulösen, während erhitztes Serum sich vollständig inaktiv bei der Reinjektion verhielt, schließen die Beweiskette.



Tabelle V.

Gesundes Meer- schweinchen	Peritoneal Serum von Meerschwein- chen, die mit Pferdeserum vorbehandelt wurden	Nach 24 Std. intravenös erhitztes Serum ( $\frac{1}{4}$ Std. 90°)	Resultat	Nach- injektion mit nicht er- hitztem Serum	Resultat
793	4,0	4,0	keine Er- scheinung	nach 24 Std. 1,0 Serum	sofort Erscheinung
710	4,0	3,0	dgl.	nach 30' 1,0 Serum	sofort schwere Er- scheinung
743	4,0	2,0	ø	nach 24 Std. 1,0 Serum	dgl.
590	4,0	2,0	ø	nach $\frac{1}{2}$ Std. 1,0 Serum	dgl.
793	6,0	2,0	ø	nach 24 Std. 1,0 Serum	dgl.
731	6,0	2,0	ø	nach $\frac{1}{2}$ Std. 1,0 Serum	dgl.
553	6,0	3,0	ø	nach $\frac{1}{2}$ Std. 1,0 Serum	dgl.; + 5'

**Zusammenfassung.**

1) Im Pferdeserum sind zwei Körper vorhanden, der eine, der thermostabile, erzeugt das Sensibilisin, der andere, thermolabilere, löst die Erscheinungen aus (Besredka).

2) Der thermolabilere Körper ist wahrscheinlich an Eiweißkörper gebunden, durch Denaturierung derselben verliert er seine Wirksamkeit.

3) Bei den mit erhitztem Serum vorbehandelten Tieren läßt sich mit erhitztem Serum keine Anaphylaxie auslösen, wohl aber mit nicht erhitztem (Besredka).

4) Bei passiv anaphylaktisierten Tieren vermag ebenfalls nur nicht erhitztes Serum zu wirken, auf 90° erhitztes Serum ist wirkungslos.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;  
Direktor: Geheimrat Professor Dr. Heffter (Abteilung für Im-  
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter: Professor  
Dr. Friedberger).]

**Ueber den Einfluß einiger Arsenpräparate auf die  
Intensität der Bildung von bakteriellen Antikörpern  
(Agglutininen) beim Kaninchen.**

Von cand. med. **Benedetto Agazzi-Pavia.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. Februar 1909.)

Bekanntlich unterliegt die Bildung von Antikörpern gegen-  
über Bakterien im Organismus des Kaninchens bei der ge-  
wöhnlichen Art der Vorbehandlung nicht ungewöhnlichen  
Schwankungen. Diese sind jedoch relativ gering, wenn man  
nach dem Vorgang von Friedberger (1) sehr kleine, auf das  
Körpergewicht der Tiere berechnete Dosen des Antigens ein-  
mal intravenös einspritzt. Diese Methode ist durchaus ge-  
eignet, um den Einfluß verschiedenartiger Eingriffe auf die  
Antikörperbildung zu studieren. Friedberger (2) hat sie  
zuerst benutzt, um die Wirkung der Alkoholdarreicherung zu  
demonstrieren und hat eine intensivere Produktion bei ein-  
maliger Alkoholgabe, eine Verminderung durch die festgesetzte  
Darreichung von Alkohol erzielt, Versuche, die durch P. Th.  
Müller (3), Fränkel (4), Trommsdorff (5) u. a. eine  
Bestätigung erfuhren.

Eine große Reihe von Autoren haben dann den Einfluß  
anderer Substanzen und gewisser Eingriffe auf die Antikörper-  
bildung untersucht.

So stellte P. Th. Müller Untersuchungen an über den  
Einfluß der Ernährung, Trommsdorff über den Einfluß der  
Erkältung, des Hungers usw. auf die Antikörperbildung.

Es erscheint nicht uninteressant, auch den Einfluß von  
Arzneistoffen auf die Antikörperbildung zu untersuchen. Von  
derartigen Experimenten liegen seither nur Versuche über den  
Einfluß des Atropins und Pilocarpins von Salomonsen und  
Madsen (6) und eine Versuchsreihe von P. Th. Müller (7)

vor, der Tiere mit zimmetsaurem Natron (Hetol) behandelt hat. Ich will im nachstehenden über Versuche berichten, die den Einfluß einiger Arsenpräparate auf die Bildung bakterieller Antikörper zum Gegenstand haben.

Versuche nach dieser Richtung hin sind auch namentlich deshalb von Interesse, weil in jüngster Zeit Uhlenhuth und seine Mitarbeiter (8, 9) die Unterschiede in der Wirkung des Atoxyls in vitro und in vivo teilweise auf eine erhöhte Bildung trypanozider Stoffe bei den mit Atoxyl behandelten Tieren zurückführen. Wenn diese Annahme von Uhlenhuth der Wirklichkeit entsprach, so war zu erwarten, daß auch bei bakteriellen Krankheiten sich ein entsprechender Einfluß zeigen würde. Bei unserer geringen Kenntnis über die Schutzstoffe bei Protozoenkrankheiten und bei der Schwierigkeit bzw. Unmöglichkeit ihrer quantitativen Auswertung erschien es aber wünschenswert, die Annahme von Uhlenhuth bei mit Bakterien vaccinierten Tieren einer Prüfung zu unterziehen, bei denen wir über Methoden einer genauen Wertbestimmung der Sera verfügen.

Derartige Versuche habe ich auf Veranlassung von Herrn Professor Friedberger und unter seiner Leitung angestellt.

Eine Reihe von Kaninchen (im ganzen 31), die unter gleichen Versuchsbedingungen gehalten waren, wurden intravenös mit der gleichen Dosis bei 60° abgetöteter Typhusbacillen ( $\frac{1}{100}$  Oese pro kg Tier) behandelt. Es wurde der gut Antikörper bildende Stamm „Typhus Gießen“ benutzt, der bezüglich seiner antigenen Qualitäten von Friedberger und Moreschi (10) genauer studiert worden ist. Frühestens 24 Stunden nach der Vaccination mit diesem Stamm wurde ein Teil der Tiere intravenös mit verschiedenen Arsenpräparaten behandelt. Es kamen zur Verwendung Acidum arsenicosum, Atoxyl, Arsenophenylglycin [Ehrlich (11)], Mischung von Atoxyl und Thioglykolsäure [Friedberger (12)]. Die Dosen sind aus den nachstehenden Tabellen ersichtlich. Die erste Injektion dieser Arsenpräparate geschah 24 Stunden nach der Vorbehandlung mit Typhusbakterien. Nach weiteren 24 Stunden und nach 5 Tagen wurde diese Behandlung nochmals wiederholt, 8 resp. 11 Tage nach den letzten Behandlungen mit dem

Arsenpräparat wurde allen Tieren, die zusammen mit den Kontrollen unter gleichen Versuchsbedingungen gehalten waren, Blut entnommen und bei dem 24 Stunden alten Serum der Agglutinationswert bestimmt. Natürlich war vorher auch der Agglutinationstiter der normalen Sera bestimmt worden. Die Agglutinationswerte wurden in der Weise titriert, daß fallende Serummengen in 1 ccm physiologische Kochsalzlösung mit einer Oese 24-stündiger Kultur des Bact. typhi-Gießen beschickt und 2 Stunden im Brutschrank belassen wurden. Die Ablesung erfolgte nach weiteren 18 Stunden Aufenthalt bei Zimmertemperatur makroskopisch. Die Versuche sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt (siehe unten Tabelle I und Tabelle II u. III auf p. 739).

Aus den Tabellen ergibt sich nun, daß die mit den verschiedenen Arsenpräparaten behandelten Tiere durchgehend bedeutend stärkere Antikörperproduktion zeigen, als die Kontrollen.

Die erhöhte Antikörperbildung unter dem Einfluß des Arsenniks ist vielleicht nur der Ausdruck einer Steigerung der Stoffwechseltätigkeit überhaupt, wie sie ja bekanntlich dem Arsenik zukommt. Auch der Alkohol, der bei der einmaligen Darreichung größerer Dosen nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren eine Erhöhung der Intensität des Eiweißstoffwechsels bewirkt, hat ja zugleich eine Vermehrung bakterieller Antikörper zur Folge.

Tabelle I.

No. des Tieres	Gewicht des Tieres in Gramm	Titer des normal. Serums	Dosis des bei 60° abgetöteten Bact. typhi-Gießen, intravenös	Dosis in Gramm Atoxyls, mit dem die Tiere 3 mal behandelt wurden	Titer des Serums am 16. Tage nach der Vaccinisierung					
					1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
28 A	1770	1/10 +	1/100 Oese pro Kilo	0,04 pro Kilo	+++	+++	++	+	+	—
30 A	1580	1/10 —	do.	do.	+++	+++	++	+	—	—
31 A	1780	1/10 —	do.	do.	+++	+++	++	+	+	—
34 A Kontr.	1800	1/10 —	do.	—	++	++	+	—	—	—
35 A	1500	1/10 —	do.	—	++	++	+	—	—	—
36 A	1370	1/10 —	do.	—	++	++	+	+	—	—
37 A	1770	1/10 —	do.	—	+++	++	++	+	—	—

Tabelle II.

No. des Tieres	Gewicht des Tieres in Gramm	Titer des normalen Serums	Dosis der bei 60° abgetöteter Bact. typhi-Gießen, intravenös	Dosis pro kg Tier der Arsenpräparate, mit denen d. Tiere 3mal behandelt wurden; intravenös	Titer des Serums am 19. Tag nach der Vaccinisierung					
					1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
53 A	2120	1/40 +	1/100 Oese pro kg	0,002 As <sup>2</sup> O <sup>3</sup>	+++	+++	++	+	—	—
60 A	2030	1/40 +	do.	0,002 „	+++	+++	++	++	+	—
58 A	1590	1/10 —	do.	0,002 „	+++	+++	++	+	—	—
74 A	1530	1/10 —	do.	0,002 „	+++	+++	+++	+	—	—
56 A	1090	1/10 —	do.	0,002 „	+++	++	+	+	—	—
73 A	2280	1/40 +	do.	0,05 Atoxyl	+++	+++	++	+	—	—
64 A	1800	1/10 —	do.	0,05 „	+++	++	+	+	—	—
55 A	1570	1/10 —	do.	0,05 „	+++	+++	++	+	—	—
69 A	1260	1/40 +	do.	0,05 „	+++	+++	++	+	—	—
75 A	2200	1/20 +	do.	0,05 Arsenophenylglycin	+++	+++	+	+	—	—
54 A	1820	1/20 +	do.	0,05 „	+++	++	+	+	—	—
67 A	1420	1/10 —	do.	0,05 „	+++	++	+	+	—	—
71 A	1100	1/40 +	do.	0,05 „	+++	+++	++	++	+	—
61 A Kontr.	2080	1/40 +	do.	—	++	+	+	—	—	—
59 A	1590	1/10 —	do.	—	++	+	—	—	—	—
68 A	1350	1/10 —	do.	—	++	+	—	—	—	—
57 A	1370	1/10 —	do.	—	+++	+++	++	+	—	—
70 A	960	1/40 —	do.	—	++	+	—	—	—	—

Tabelle III.

No. des Tieres	Gewicht des Tieres in Gramm	Titer des normalen Serums	Dosis der bei 60 ° abgetöteten Bact. typhi-Gießen, intravenös	Dosis in Gramm der Mischung Atoxyl und Thioglykol- säure 1 <sup>1</sup> / <sub>10</sub> ää	Titer des Serums am 16. Tag nach der Vaccinisierung									
					1/ <sub>20</sub>	1/ <sub>40</sub>	1/ <sub>80</sub>	1/ <sub>160</sub>	1/ <sub>320</sub>	1/ <sub>640</sub>	1/ <sub>1280</sub>	1/ <sub>2560</sub>	1/ <sub>5120</sub>	
83 A	1750	1/ <sub>10</sub> +	1/ <sub>100</sub> Oese pro. kg	0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	
84 A	1920	1/ <sub>10</sub> —	do.	0,5	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	
85 A	1770	1/ <sub>20</sub> +	do.	0,5	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	
86 A	2260	1/ <sub>10</sub> —	do.	0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	
Kontr.														
87 A	1960	1/ <sub>10</sub> —	do.	—	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	
88 A	1740	1/ <sub>10</sub> +	do.	—	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—	

### **Zusammenfassung.**

Die Darreichung von verschiedenen Arsenpräparaten bei mit abgetöteten Typhusbakterien intravenös behandelten Kaninchen bewirkt eine bedeutende Steigerung der Agglutininbildung.

### **Literatur.**

- 1) Friedberger, Festschrift zum 70. Geburtstag E. v. Leydens.
- 2) Friedberger, Comptes rendus du XIII. Congrès internat. d'Hygiène et de Démographie, Bruxelles 1903, T. 2, p. 52.
- 3) Müller, P. Th., Wiener klin. Wochenschr., 1903, No. 11.
- 4) Fraenkel, C., Berliner klin. Wochenschr., 1905, p. 242.
- 5) Trommsdorff, Archiv für Hygiene, Bd. 59.
- 6) Salomonsen und Madsen, zit. nach Baumgartens Jahresbericht, 1898.
- 7) Müller, P. Th., Archiv für Hygiene, Bd. 51.
- 8) Uhlenhuth und Bickel, Mitteilungen a. d. K. Gesundheitsamt, 1907.
- 9) Uhlenhuth, Hübner und Woihe, ibid., 1908.
- 10) Friedberger und Moreschi, Berliner klin. Wochenschr., 1905, No. 45.
- 11) Ehrlich, Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 42, 1909, H. 1.
- 12) Friedberger, Berl. klin. Wochenschr., 1908.

### **Berichtigung.**

In der Arbeit von Margarete Stern „Eine Vereinfachung und Verfeinerung der serodiagnostischen Syphilisreaktion“ (Heft 3) muß es Seite 424, Tabelle I, heißen:

2. Kolonne, Zeile 2, 5 und 8 anstatt 0,5: 0,05.

Letzte Kolonne, Zeile 5 anstatt 0,008: 0,0008.

[Aus dem dänischen Seruminstitut, Kopenhagen.]

**Ueber die Spezifität der Serumanaphylaxie und die Möglichkeit ihrer Anwendung in der medikoforensischen Praxis zur Differenzierung von Menschen- und Tierblut (in Blutflecken etc.).**

Von Dr. Oluf Thomsen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Februar 1909.)

Durch die in den letzten zwei Jahren gemachten Erfahrungen auf dem Gebiet der Anaphylaxie, besonders bei artfremdem Serum, könnte es möglich erscheinen, das Phänomen der Anaphylaxie zur Grundlage einer einfachen, technisch sehr leicht ausführbaren Methode zu machen zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut in Blutspuren, die bei dem Gerichtsarzt zur Untersuchung gelangen.

Die bisherigen Beobachtungen, die eine solche Erwartung als begründet erscheinen lassen, sind folgende:

1) Meerschweinchen, denen eine Serumart subkutan, intraperitoneal oder direkt in den Kreislauf injiziert ist, werden so sensibilisiert, daß sie nach einer Inkubation von 10 bis 12 Tagen mit heftigen <sup>1)</sup> Symptomen reagieren (Unruhe, Jucken,

---

1) Die Anaphylaxiesymptome zeigen in der Regel ein sehr typisches und leicht zu erkennendes Krankheitsbild: Während der ersten 5 Minuten nach der Injektion zeigt das Tier nichts Auffälliges. Dann (selten über 5—10 Minuten nach der Injektion) wird das Tier unruhig, läuft von einer Seite des Käfigs zur anderen, ist geneigt, sich für einen Augenblick unter anderen Tieren zu verkriechen, um dann gleich wieder ein anderes Versteck zu suchen. Fast gleichzeitig stellt sich augenscheinlich starkes Jucken ein, das Tier bleibt stehen und kratzt sich energisch, gewöhnlich zuerst mit den Hinterfüßen. Vor allem wird der Kopf, insbesondere der Mund, bearbeitet, oft wird die Hinterpfote ganz in den Mund hineingesteckt und an den Zähnen gerieben.

Bald werden auch beide Vorderfüße zugleich zum Reiben von Mund und Schnauze verwendet. Die Aufgeregtheit hat nunmehr (15—20 Minuten nach der Injektion) etwas nachgelassen, und eine gewisse allgemeine Schwäche

Störungen der Respiration, Paresen, Krämpfen, Kollaps und eventuell Tod), in unmittelbarer Folge einer neuen Injektion derselben Serumart.

2) Die sensibilisierende Dosis braucht nur sehr gering zu sein (0,01—0,001 ccm). Sogar ein so geringes Quantum wie 0,000001 ccm wurde von Rosenau und Anderson<sup>1)</sup> in einem Falle als ausreichend befunden.

3) Je geringer die sensibilisierende Dosis ist, um so kürzer ist auch die Inkubation, doch läßt sie sich nicht auf weniger als 9—12 Tage herabmindern.

4) Die sensibilisierende Wirkung des Serums ist äußerst resistent, indem sie durch Eintrocknen, Erwärmung, Einwirkung von Luft und Licht etc. nur schwer destruiert wird.

Somit möchte die Möglichkeit vorzuliegen scheinen, Meer-schweinchen mit einem wässerigen Extrakt aus dem gegebenen Blutfleck zu sensibilisieren und darauf nach 10—12-tägiger Inkubation anaphylaktische Symptome hervorzubringen durch Injektion eines Serums von derselben Tierart, von der der Blutfleck herrührt.

Um nun festzustellen, ob die Wirklichkeit überhaupt diesen theoretischen Erwägungen entsprechen würde, wurden folgende Versuche angestellt:

hat sich des Tieres bemächtigt. So sieht man häufig, daß das Tier sich augenscheinlich mit dem Hinterfuß kratzen möchte, das Bein bleibt aber, ehe es den Kopf erreicht, stehen und sinkt kraftlos zurück. 25—30 Minuten nach der Injektion zeigt sich deutliche Dyspnoë, das Tier ist nunmehr sehr schwach, der hintere Körper oft paretisch, dann und wann versucht es sich zu kratzen, kauert in einem Winkel, die Haare starren. Das Tier fällt dann um auf die Seite oder den Rücken, bleibt nach Luft schnappend liegen, oft mit hörbarer Respiration, kann sich nochmals erheben und wieder umfallen. Häufig stellen sich dann heftige klonische Krämpfe ein, die in wenigen Minuten mit dem Tod enden. Doch kann das Tier sich jederzeit während der Krankheit erholen, auch wenn es anscheinend im Sterben begriffen ist. Die Besserung verläuft dann schnell. Wenige (3—4) Stunden nach der Injektion ist es wieder lebhaft und natürlich. Der Tod durch Anaphylaxie erfolgt gewöhnlich im Verlauf einer Stunde, sehr selten in mehr als 2 Stunden nach der Injektion. Erfolgt der Tod erst nach etlichen Stunden, darf er nicht als Folge der Anaphylaxie gelten.

1) Rosenau and Anderson, A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Hygien. Laboratory Bulletin No. 29, 1906, Wash.



Drei Meerschweinchen (Gewicht ca. 300 g) wurde wässriger Extrakt aus einem  $1\frac{1}{2}$  Monate alten Fleck von Pferdeblut auf leinenem Fetzen injiziert. Die für den Extrakt verwendete Leinwand war etwa 1 qcm groß, gleichmäßig mit Blut getränkt, so daß sie vermutlich ca.  $\frac{1}{10}$  ccm Blut in sich aufgenommen hatte. Das Stück wurde in 5 ccm einer 0,9-proz. Kochsalzlösung gelegt und in dieser Lösung ausgefaser. Von dem deutlich hämoglobinfarbigem Extrakt wurden den Meerschweinchen intraperitoneal injiziert:  $\frac{1}{2}$  ccm, 1 ccm und 2 ccm (= ca.  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{25}$  ccm Blut). Einem vierten Meerschweinchen wurde  $\frac{1}{100}$  ccm Pferdeserum intraperitoneal injiziert. Nach 14 Tagen wurden allen 4 Tieren sowie einem frischen Tier zur Kontrolle 8 ccm Pferdeserum intraperitoneal gegeben.

Meerschweinchen No.	Sensibilisiert mit	Symptome nach der Injektion, 14 Tage später, von 8 ccm Pferdeserum intraperitoneal
1	$\frac{1}{2}$ ccm Extrakt, ca. $\frac{1}{100}$ ccm Blut	Anfang der Symptome 12 Min. nach der Injektion (Zucken, Unruhe). 30 Min. nach der Injektion Parese des Hinterteils, Dyspnoë. Blieb am Leben
2	1 ccm Extrakt, ca. $\frac{1}{50}$ ccm Blut	Heftige Symptome. Starb 60 Min. nach der Injektion
3	2 ccm Extrakt, ca. $\frac{1}{25}$ ccm Blut	Heftige Symptome. Starb 90 Min. nach der Injektion
4	$\frac{1}{100}$ ccm Pferdeserum	Heftige Symptome. Starb 70 Min. nach der Injektion
5	0	Keine Symptome

Somit ergab sich, daß alle 3 mit Extrakt des Blutfleckes sensibilisierten Tiere sehr heftige Symptome aufwiesen, und daß 2 dieser Tiere, wie auch das mit Pferdeserum sensibilisierte, starben. War also die Möglichkeit erwiesen, mittels Extraktes aus einem  $1\frac{1}{2}$  Monate alten Blutfleck ebenso starke Anaphylaxie hervorzurufen, als mit frischem Serum, so blieb doch noch eine sehr wichtige Frage unbeantwortet: die Frage von der Spezifität der Anaphylaxie.

Was hierüber in der Literatur vorliegt, ist nicht übereinstimmend. v. Pirquet und Schick<sup>1)</sup> behaupten für das durch Reinjektion von Serum an Kaninchen erzeugte Oedem eine strenge Spezifität. Kaninchen, denen erst Pferdeserum injiziert war, reagierten nicht auf Schweineserum; bei

1) v. Pirquet und Schick, Die Serumkrankheit, Wien 1905, p. 121 f.

wiederholter Injektion entwickelte sich nur dann ein spezifisches Oedem, wenn das Antigen bei der ersten und zweiten Injektion das gleiche war.

In dem weitesten Umfang haben Rosenau und Anderson<sup>1)</sup> Versuche gemacht, indem sie einerseits eine größere Anzahl von Meerschweinchen mit Pferdeserum sensibilisierten und dann, nach passender Inkubation, den sensibilisierten Tieren verschiedene Serumarten (Hund, Katze, Schaf, Ochse etc.) injizierten, andererseits Meerschweinchen mit kleinen Mengen von verschiedenen Serumarten (Hund, Katze, Schaf, Ochse etc.) sensibilisierten und dann, nach Ablauf der Inkubation, den so behandelten Tieren Pferdeserum injizierten. In allen diesen Fällen sind also heterologe Sera zur Sensibilisierung und zur Auslösung der anaphylaktischen Symptome benutzt worden. Es zeigte sich nun, daß ein dem sensibilisierenden Serum homologes Serum konstant sehr heftige Symptome, meistens auch den Tod mit sich brachte, dagegen von den mit heterologem Serum behandelten Meerschweinchen keines starb. Einige von ihnen freilich wiesen deutliche, aber verhältnismäßig schwache und vorübergehende Anaphylaxiesymptome auf. Als Endergebnis stellen Rosenau und Anderson daher den Satz auf, daß die Serumanaphylaxie nicht absolut spezifisch, sondern relativ oder quantitativ ist.

Im Gegensatz hierzu haben Gay und Southard<sup>2)</sup> eine bei weitem weniger ausgesprochene Spezifität gefunden, doch scheinen diese Verff. keine selbständigen Untersuchungen mit verschiedenen Serumarten, sondern mit anderen Proteinstoffen unternommen zu haben; so fanden sie z. B., daß mit Eieralbumin oder Milch sensibilisierte Meerschweinchen auch mit heftigen anaphylaktischen Symptomen auf eine spätere Injektion von Pferdeserum reagierten: Untersuchungen, die in scharfem Widerspruch zu denen von Rosenau und Anderson stehen<sup>3)</sup>. Letztere Verff. fanden gerade, daß die Anaphylaxie absolut

1) Rosenau und Anderson, l. c.

2) Gay and Southard, The relative specificity of anaphylaxis. The Journal of Medical Research, Vol. 19, 1908, No. 1.

3) Rosenau and Anderson, Studies upon hypersusceptibility and immunity. Hygienic Laboratory Bulletin No. 36, 1907, Wash.

spezifisch sei, wenn so verschiedene Eiweißstoffe, wie z. B. Eieralbumin und Pferdeserum, zur Sensibilisierung, bezw. zur Auslösung der Anaphylaxie benutzt wurden.

Bei meinen oben erwähnten Versuchen mit Sensibilisierung mittels wässerigen Extraktes aus einem Pferdeblutpfleck hatte sich ergeben, daß 8 ccm Pferdeserum, intraperitoneal gegeben, bei den sensibilisierten Tieren heftige Symptome hervorriefen, bei einem frischen zur Kontrolle herangezogenen Tier dagegen überhaupt keine. Daß somit Pferdeserum an sich, auch in ziemlich großer Dosis gegeben, für Meerschweinchen ungiftig ist, ist übrigens wohl bekannt. Nicht weniger bekannt ist aber, daß andere Serumarten mehr oder weniger starke toxische Wirkungen auf Meerschweinchen erzeugen, und zwar teils lokale, teils generelle. So konstatierte Uhlenhuth<sup>1)</sup> zuerst, daß subkutane Injektion kleiner Serumdosen (0,5 ccm) von Mensch, Schaf, Schwein und Kaninchen beim Meerschweinchen Infiltrationen an der Injektionsstelle erzeugt. Große Mengen (15—20 ccm) verursachten Nekrose. Ochsen-serum in Dosen zu 10—15 ccm tötete die Meerschweinchen, während auch große Dosen Pferdeserum (20 ccm) weder lokale noch generelle Wirkungen zeigten.

Eingehender ist dieses später von H. Pfeiffer<sup>2)</sup> untersucht worden, der mit Ochsen-serum, Menschen-serum und Schweineserum starke Nekrose erzeugende Wirkungen auf Meerschweinchen, mit Schaf-, Kaninchen- und Pferdeserum dagegen geringe oder keine Wirkung dieser Art fand.

Was die generelle Wirkung einer intraperitonealen Injektion von 4—6 ccm Serum betrifft, so habe ich diese mit Ochsen-, Ziegen-, Menschen-, Tauben-, Hühner-, Schaf-, Kaninchen- und Pferdeserum untersucht. Die dafür verwendeten Meerschweinchen hatten alle das gleiche Gewicht (250—300 g) und waren alle ganz frische Tiere. Am stärksten war die Giftwirkung des Ochsen-serums, dann die des Ziegen-serums usw. in gleicher Reihenfolge, wie die Serumarten oben genannt sind. Wie ersichtlich, stimmt die generelle

1) Uhlenhuth, Zur Kenntnis der giftigen Eigenschaften des Blut-serums. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 26, 1897.

2) H. Pfeiffer, Ueber die nekrotisierende Wirkung normaler Sera. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 51, 1905.

Wirkung mit der Nekrose erzeugenden überein, die beobachteten Symptome waren im großen und ganzen die gleichen, bloß mit schwankender Intensität.

Ein frisches Meerschweinchen, dem 5 ccm Ochsen Serum intraperitoneal injiziert werden, fängt sehr bald (2—3 Minuten) nach der Injektion an, krankhaft zu erscheinen, Urin und Faeces gehen ab, es verkriecht sich in einem Winkel des Käfigs und kauert sich dort zusammen. Bald darauf läßt sich eine eigentümlich feste Spannung der Bauchmuskulatur wahrnehmen. Umfaßt man das Tier, ist es hart und gespannt; es erscheint empfindlich gegen Berührung, schreit, wenn man es befühlt. Sich selbst überlassen, zeigt es Neigung, sich, ähnlich wie ein Hund, „zu setzen“, auf dem Hinterteil ruhend, mit extendierten Vorderfüßen, die Haare starren, die Augäpfel scheinen deutlicher hervorzutreten, jedenfalls ist die Sklera in größerem Umfang, als am gesunden Tier, sichtbar. Die Respirationsfrequenz ist wenig oder nicht erhöht.  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde nach der Injektion ist bisweilen eine leichte Parese des Hinterteils bemerkbar. 1—1 $\frac{1}{4}$  Stunde nach der Injektion hat die Spannung der Muskulatur größtenteils nachgelassen, das Tier wird immer schlaffer und stirbt gewöhnlich nach 8 bis 12 Stunden (von 4 Tieren starben 3, das vierte blieb am Leben und bekam eine Nekrose der Haut an der Bauchwand im Umfang eines Zweikronenstückes).

Die übrigen untersuchten Serumarten erwiesen sich als viel weniger giftig, indem keines der injizierten Meerschweinchen starb (jedoch wurde bei jedem Versuch nur ein Meerschweinchen benutzt). Tags nach der Injektion waren alle wieder vollkommen gesund.

H. Pfeiffer hatte in der oben erwähnten Arbeit nachgewiesen, daß es möglich sei, durch Erwärmung auf 56° die Nekrose erzeugende Wirkung des Serums zu vernichten. Bei dem Ochsen Serum mußte jedoch die Erwärmung von sehr langer Dauer sein, indem die Abschwächung erst nach Ablauf von 2 Stunden begann. Bei dem Schweineserum hingegen genügte einstündige Erwärmung, um die nekrotisierende Wirkung vollkommen zu destruieren.

Die Erwärmung schwächt indessen auch die Anaphylaxie auslösende Wirkung des Serums auf sensibilisierte Tiere ab.

Anderson und Rosenau<sup>1)</sup> fanden, daß die Erwärmung des Pferdeserums auf 100° während einer Stunde seine Anaphylaxie auslösende Wirkung vollständig destruierte, Erwärmung auf 90° während einer Stunde sie erheblich abschwächte.

Andererseits hatten Doerr und Raubitscheks<sup>2)</sup> interessante Untersuchungen über das Aalserum erwiesen, daß es eben durch Erwärmung möglich sei, die unmittelbare Giftigkeit des Aalserums (0,01 ccm intraperitoneal tötet ein frisches Meerschweinchen) von der anaphylaktisierenden, bezw. Anaphylaxie auslösenden Wirkung des Serums zu trennen.

Meine nachstehenden Versuche wurden deshalb zuerst mit nicht erwärmtem, später mit erwärmtem Serum ausgeführt.

Bei den folgenden Versuchen wurde nur nicht erwärmtes Serum benutzt:

Drei Meerschweinchen (Gewicht 300 g) wurden am 26. Okt. 1908 mit wässrigem Extrakt aus einem 2 Monate alten Fleck von Menschenblut sensibilisiert (1 qcm großer Fetzen in 10 ccm 0,9-proz. Kochsalzlösung ausgelaugt; jedem Tier wurde 1 ccm, vermutlich = ca.  $\frac{1}{100}$  ccm Blut, intraperitoneal gegeben).

Meerschweinchen 1. 9. Nov. 1908 (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: das Tier ist sofort etwas gespannt und hart, schon 10 Min. nach der Inj. fängt es an zu erschlaffen, 22 Min. nach der Inj. fällt es auf die Seite, starke Dyspnoë. Gestorben 65 Min. nach der Inj.

Meerschweinchen 2. 10. Nov. 1908 (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Hühnerserum**: während 10—20 Min. nach der Inj. ist das Tier etwas gespannt und hart. 45 Min. nach der Inj. ganz natürlich.

11. Nov. (16 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Pferdeserum**; während der ersten 30 Min. etwas stumpf, dann natürlich.

13. Nov. (18 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: 25 Min. nach der Inj. typische Anaphylaxiesymptome. 56 Min. nach der Inj. heftige Krämpfe. Gestorben 58 Min. nach der Inj.

Meerschweinchen 3. 9. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Schafserum**: schon 3—4 Min. nach der Inj. fühlt sich das Tier sehr hart und fest an, schreit, wenn es umfaßt wird. 40 Min. nach der Inj. ist der Hinterleib etwas schlaff, das eine Bein schleppt nach. 70 Min. nach der Inj. natürlich.

1) Anderson and Rosenau, Further studies upon anaphylaxis. The Journ. of Med. Research, Vol. 19, 1908, No. 1.

2) Doerr und Raubitschek, Toxin und anaphylaktisierende Substanz des Aalserums. Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 33.

10. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: während der ersten Minuten hart und fest, schon 10 Min. nach der Inj. wieder schlaff, 20 Min. nach der Inj. Parese des Hinterleibes, fällt um, starke Dyspnoë. 1½ Stunde nach der Inj. ist es wieder so weit hergestellt, daß es sich augenscheinlich erholen wird. Bleibt am Leben.

11. Nov. (16 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Pferdeserum**: keine Symptome.

13. Nov. (18 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: schwache klonische Zuckungen während der ersten 30 Min. nach der Inj.

20. Nov. (25 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Ochsenserum**: 2 bis 3 Min. nach der Inj. tritt Spannung der Bauchmuskeln ein, das Tier fühlt sich sehr hart an. Gestorben<sup>1)</sup> 16 Stunden nach der Inj.

Es ergab sich also an diesen drei Meerschweinchen unzweideutige Anaphylaxie für **Menschenserum**.

Bei den folgenden Versuchen wurde ebenfalls nicht erwärmtes Serum benutzt.

Drei Meerschweinchen (Gewicht ca. 300 g) wurden am 26. Okt. 1908 mit wässerigem Extrakt aus einem 2½ Monate alten Fleck von Hühnerblut sensibilisiert (1 qcm großer Fetzen, in 10 ccm 0.9-proz. Kochsalzlösung ausgelaugt; hiervon wurde jedem Tier 1 ccm, vermutlich = ca. 1/100 ccm Hühnerblut gegeben).

Meerschweinchen 1. 10. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Hühnerserum**: 4 Min. nach der Inj. starke Aufgeregtheit und klonische Zuckungen, 12 Min. nach der Inj. erschläft es, taumelt, fällt: 20 Min. nach der Inj. hochgradig dyspnoisch, liegt auf der Seite, im Sterben. Erhebt sich dann und fällt wieder um. 1 Stunde nach der Inj. fängt es an sich zu erholen und ist nach 3 Stunden ganz restituiert.

11. Nov. (16 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Ochsenserum**: gleich nach der Injektion etwas gespannte und kontrahierte Muskulatur. Gestorben ca. 30 Stunden nach der Inj.

Meerschweinchen 2. 9. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: stark kontrahierte Muskulatur, dann leichte Parese des Hinterleibes. 1½—2 Stunden nach der Inj. hergestellt.

10. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Hühnerserum**: sehr heftige Krämpfe. Gestorben 20 Min. nach der Inj.

Meerschweinchen 3. 9. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Schafserum**: starke Kontraktion der Muskulatur, die 60—70 Min. andauert. Dann ganz gesund.

10. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Menschenserum**: einige Unruhe und leichte Parese der Hinterbeine.

1) Der Tod war hier keine Folge von Anaphylaxie, sondern der unmittelbaren Giftwirkung des Ochsenserums (s. oben).

11. Nov. (16 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Pferdeserum: keine wahrnehmbaren Symptome.

13. Nov. (18 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Hühnerserum**: sehr starke Parese des Hinterleibes, Dyspnoë; erholt sich 1 $\frac{1}{4}$  Stunde nach der Inj. und bleibt am Leben.

Auch dieser Versuch ergab ausgesprochene Anaphylaxie für Hühnerserum.

Bei dem folgenden Versuch wurde teils erwärmtes, teils nicht erwärmtes Serum benutzt. (Wo nichts angegeben, wurde das Serum nicht erwärmt.)

Drei Meerschweinchen (Gewicht ca. 300 g) wurden am 10. Nov. mit wässrigem Extrakt aus einem 2 Monate alten Fleck von Ziegenblut sensibilisiert in derselben Weise, wie oben beschrieben.

Meerschweinchen 1. 22. Nov. (12 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ochsen血清, während 1 Stunde auf 56° erwärmt: schwache, aber typische anaphylaktische Symptome (Jucken, Unruhe, leichte klonische Zuckungen). 2 Stunden nach der Inj. hergestellt.

Meerschweinchen 2. 24. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Ziegenserum**: gleich nach der Inj. ist die Muskulatur kontrahiert. Schon nach Verlauf einer Viertelstunde erschläft das Tier, zeigt Parese des Hinterleibes, fällt. Gestorben 65 Min. nach der Inj.

Meerschweinchen 3. 25. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Ziegenserum**, während 1 $\frac{1}{4}$  Stunde auf 56° erwärmt: 18 Min. nach der Inj. heftiges Jucken, Unruhe, fällt. 30 Min. nach der Inj. liegt es hochgradig dyspnoisch auf der Seite. 65 Min. nach der Inj. heftige Krämpfe. Gestorben 70 Min. nach der Inj.

Dieser Versuch ergab, daß die Tiere für Ziegenserum stark anaphylaktisiert wurden, daß aber auch erwärmtes Ochsen血清 deutlich erkennbare anaphylaktische Symptome hervorrief.

Bei dem folgenden Versuch wurde teils (wo solches angegeben) erwärmtes, teils nicht erwärmtes Serum benutzt.

Drei Meerschweinchen (Gewicht ca. 300 g) wurden am 10. Nov. 1908 mit wässrigem Extrakt aus einem ca. 1 Monat alten Fleck von Ochsenblut sensibilisiert (in derselben Weise wie oben).

Meerschweinchen 1. 24. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Kaninchenserum: keine Symptome.

25. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Ochsen血清** (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): 18 Min. nach der Inj. typische anaphylaktische Symptome (Jucken, klonische Zuckungen, Parese des Hinterleibes, Dyspnoë). Blieb am Leben.

Meerschweinchen 2. 25. Nov. (15 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): schwache, aber typische Anaphylaxie (Jucken, Unruhe). 1¼ Stunde nach der Inj. ganz hergestellt.

Meerschweinchen 3. 24. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ziegen serum: gleich nach der Inj. starke Kontraktion der Muskulatur, dann und wann leichte klonische Zuckungen die erste halbe Stunde nach der Inj. 1¼ Stunde nach der Inj. ganz hergestellt.

27. Nov. (17 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während ¼ Stunde auf 56° erwärmt): 25 Min. nach der Inj. leichte, aber deutliche Anaphylaxiesymptome (Jucken, Unruhe).

Somit ergab sich, daß der Extrakt des Ochsenblutfleckes für Ochsen serum deutlich erkennbare Anaphylaxie zeitigte, für Schaf- und Ziegen serum eine geringere.

Bei dem folgenden Versuch wurde nur erwärmtes Serum benutzt.

Drei Meerschweinchen (Gewicht 300 g) wurden am 11. Nov. 1908 mit wässrigem Extrakt aus einem 2 Monate alten Fleck von Schafblut sensibilisiert (in gleicher Weise wie oben).

Meerschweinchen 1. 22. Nov. (11 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ochsen serum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): leichte Anaphylaxiesymptome (Jucken, Unruhe, leichte Parese des Hinterleibes). 1¼ Stunde nach der Inj. vollkommen gesund.

Meerschweinchen 2. 24. Nov. (13 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ziegen serum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): leichte anaphylaktische Symptome 20 Min. nach der Inj., welche ca. 30 Min. anhielten (Jucken, Unruhe).

25. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): deutliche Anaphylaxiesymptome (es kratzt sich heftig 14 Min. nach der Inj., Unruhe, leichte Dyspnoë). 2 Stunden nach der Inj. gesund.

Meerschweinchen 3. 25. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): ausgesprochene Anaphylaxiesymptome (Jucken, Unruhe, Dyspnoë, Parese des Hinterleibes). Nach Verlauf von 2 Stunden gesund.

Auch dieser Versuch ergab, daß die Tiere für das dem sensibilisierenden Blutfleck homologe Serum scharf ausgeprägte Anaphylaxie, für Ochsen- und Ziegen serum eine geringere Anaphylaxie zeigten.



Bei dem folgenden Versuch wurde teils erwärmtes, teils nicht erwärmtes Serum benutzt.

Drei Meerschweinchen (Gewicht ca. 300 g) wurden am 11. Nov. 1908 mit wässrigem Extrakt aus einem 2 Monate alten Fleck von Kaninchenblut sensibilisiert (in gleicher Weise wie oben).

Meerschweinchen 1. 24. Nov. (13 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Kaninchenserum** (nicht erwärmt): leichte Anaphylaxiesymptome (Jucken, einige Schwäche des Hinterleibes). 1¼ Stunde nach der Inj. gesund.

25. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ochsen Serum (während 1¼ Stunden auf 56° erwärmt): keine Symptome.

27. Nov. (16 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): keine Symptome, abgesehen von einiger Stumpfheit während der ersten halben Stunde.

Meerschweinchen 2. 24. Nov. (13 Tage nach der Sensib.) 5 ccm **Kaninchenserum** (nicht erwärmt): keine wahrnehmbaren Symptome.

25. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ziegenserum: während 1 Stunde nach der Inj. etwas stumpf; sonst keine Symptome.

Meerschweinchen 3. 24. Nov. (13 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Ziegenserum (nicht erwärmt): während 1¼—2 Stunden starke Kontraktion der Bauchmuskulatur.

25. Nov. (14 Tage nach der Sensib.) 5 ccm Schafserum (während 1 Stunde auf 56° erwärmt): keine Symptome.

Dieser Versuch ergab, daß der Extrakt aus dem Fleck von Kaninchenblut für Kaninchenserum nur ganz geringe, für die übrigen untersuchten Serumarten keine oder doch nur rudimentäre Anaphylaxie erzeugte.

Das vorläufige Resultat der besprochenen Sensibilisierungsversuche mit Extrakt aus mehrere Monate altem, eingetrocknetem Blut (von Pferd, Mensch, Huhn, Ziege, Ochse, Schaf, Kaninchen) war, daß die Sensibilisierung ebenso gut gelang, wie bei der Benutzung frischen Serums. Daß eine augenscheinliche, meistens sogar sehr augenfällige, Spezifizität der Anaphylaxie vorlag, mußte als unzweifelhaft gelten. Doch ließ sich schon jetzt sicher feststellen, daß die Spezifizität nicht absolut sei, daß dagegen unzweifelhaft wenigstens eine Verwandtschaftsreaktion verwandter Tierarten bestehe, so daß z. B. mit Ochsenblut sensibilisierte Meerschweinchen auch auf Injektion von Schaf- und vielleicht Ziegenserum anaphylaktisch reagierten, mit Ziegen- bzw. Schafblut sensibilisierte Meerschweinchen auch auf erwärmtes Ochsen- und Schafserum, bzw.

Ziegenserum reagierten — obwohl in weniger hohem Grad, als wo homologes Serum benutzt wurde. Auch war die Möglichkeit nicht abzuweisen, daß einige der mit Blut einer Tierart sensibilisierten und dann mit dem Serum einer anderen, entfernten Art (z. B. Sensibilisierung mit Menschenblut und folgende Injektion von Hühnerserum) behandelten Meerschweinchen mehr oder minder starke Anaphylaxiesymptome aufgewiesen haben würden, wenn nicht die auf Rechnung der unmittelbaren Giftwirkung nicht erwärmten Serums zu schreibenden Symptome überwuchert hätten.

Hinsichtlich der sensibilisierenden Wirkung des Kaninchenblutes schien der gemachte Versuch darauf hinzuweisen, daß das Blut des Kaninchens, vielleicht wegen der nahen Verwandtschaft mit dem Meerschweinchen, nur schwache Anaphylaxie hervorruft.

Um nun zu untersuchen, wie weit es möglich ist, die Anaphylaxie zum Prinzip einer praktisch brauchbaren mediko-forensischen Methode zu machen, wurde folgendes Experiment angestellt: aus 7 gleichartigen Leinwandstücken mit 2—3 Monate alten Blutflecken verschiedenen Ursprunges schnitt der Direktor, Dr. Th. Madsen, je einen 1 qcm großen Fetzen heraus; diese Fetzen wurden mir, gezeichnet I—VII, für die Untersuchung überlassen. Nur Dr. Madsen wußte, welchem Tier das Blut jedes Fetzens entnommen war, jedoch war mir bekannt, daß die 7 Arten von Blut folgende seien: Menschen-, Pferde-, Hühner-, Tauben-, Schaf-, Ziegen-, Kaninchenblut.

Aus den 7 Fetzen wurden, indem jeder in 10 ccm 0,9-proz. Kochsalzlösung ausgefasert wurde, 7 Extrakte hergestellt. Aus jedem Extrakt wurden am 17. Nov. 1908 3 Meerschweinchen mit je 1 ccm Extrakt (vermutlich ca.  $\frac{1}{100}$  ccm Blut) intraperitoneal sensibilisiert.

Bei den folgenden Versuchen, die in nachstehender Tabelle (A) verzeichnet sind (siehe p. 754 und 755), wurde, wo nichts Besonderes angegeben ist, nur erwärmtes Serum benutzt.

Bei der Bezeichnung des Schemas „unerhebliche (Anaphylaxie-)Symptome“ ist zu verstehen: leichte Unruhe und Jucken. Bei „leichte (Anaphylaxie-)Symptome“: Unruhe, Jucken, allgemeine Schwäche, wobei das Tier etwas taumeln

kann, jedoch nicht umfällt. Bei „schwere (Anaphylaxie-)Symptome“: Unruhe, Jucken, Parese, wobei das Tier fällt, Dyspnoë, Krämpfe.

#### **Zusammenfassung der Untersuchungsreihe A.**

Am 1. Dez. wurden I 1, II 2, III 1, IV 1, V 3, VI 1, VII 1 je 6 ccm Pferdeserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

III 1 zeigt unerhebliche Anaphylaxiesymptome (kratzt sich wiederholt).

IV 1 zeigt schwere Anaphylaxiesymptome (Unruhe, Jucken, Dyspnoë, fällt einmal um, erhebt sich schnell wieder und erholt sich (1 Stunde nach der Inj.). Bei den anderen Tieren keine Anaphylaxiesymptome.

Weil von den so behandelten Tieren nur IV 1 schwere, jedoch nicht maximale Anaphylaxiesymptome gezeigt hatte, wurde der gleiche Versuch mit IV 2 gemacht. Das Tier reagierte sehr heftig (war sehr dyspnoisch, 30 Min. nach der Inj. fast im Sterben begriffen, blieb aber doch am Leben).

Auf Grund des Experimentes wurde auf dem Fetzen IV Pferdeblut vermutet.

Am 2. Dez. wurden I 2, II 1, III 2, IV 3, V 1, VI 2, VII 2 je 5 ccm Menschenserum (während 10 Min. auf 56° erwärmt) injiziert. Alle Tiere waren während der ersten 30 Min. etwas leidend, mit kontrahierter Muskulatur, unzweifelhaft eine Folge zu kurzweiliger Erwärmung des benutzten Serums. Deutliche Anaphylaxiesymptome wurden an den Tieren I—VI nicht wahrgenommen, leichte Symptome können dagegen infolge der unmittelbaren Giftwirkung des Serums unerkannt geblieben sein.

VII 2 ist ebenfalls gleich nach der Injektion hart mit kontrahierter Muskulatur. 30 Min. nach der Inj. zeigen sich typische Anaphylaxiesymptome: Parese, heftige Dyspnoë, es fällt um und stirbt 70 Min. nach der Inj.

VII 3 wurden demnächst 5 ccm Menschenserum (während 30 Min. auf 56° erwärmt) injiziert. Sehr schwere Anaphylaxiesymptome; gestorben 1<sup>3</sup>/<sub>4</sub> Stunde nach der Inj.

Auf Grund des Experimentes wurde auf dem Fetzen VII Menschenblut vermutet.

Am 3. Dez. wurden I 1, II 2, III 1, V 3, VI 1, VII 1 je 5 ccm Kaninchenserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

I 1 und V 3 zeigten unerhebliche Anaphylaxiesymptome, und zwar leichte Unruhe während der ersten halben Stunde nach der Injektion und einiges Jucken. Bei V 3 vielleicht etwas stärkere Symptome als bei I 1.

Es ließ sich denken, daß durch die Erwärmung die Anaphylaxie auslösende Kraft des Serums etwas herabgesetzt sei; weil Kaninchenserum Meerschweinchen gegenüber meist fast ungiftig ist, wurden daher I 3, II 3, III 3, V 2, VI 3 je 5 ccm nicht erwärmtes Kaninchenserum (von denselben Kaninchen) injiziert. Alle Tiere wurden ernstlich krank<sup>1)</sup>, indem sie ganz

1) Unerwartet erwies sich also hier das Kaninchenserum im Besitz einer ausgeprägten unmittelbaren Giftwirkung zu sein.

A. Tabelle über 21, als No. I1, I2, I3, II1, II2, II3 usw. bezeichnete, am 17. Nov. 1903 mit je 1 ccm wässrigem Extrakt aus den als I—VII bezeichneten Blutflecken sensibilisierte Meerschweinchen. Jeder Abteilung gehören 3 mit je 1 ccm des gleichen Extraktes sensibilisierte Tiere. Das Serum ist in allen Fällen intraperitoneal injiziert. (S. die nachstehende Zusammenfassung.)

Meerschweinchen No.	1	2	3	
I	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 3. Dez. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sympt. 4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : unerhebliche Symptome 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : unerhebliche Symptome	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen-serum <sup>2)</sup> : deutl. Symptome 5. Dez. 3 ccm Taubenserum <sup>1)</sup> : keine Symptome 8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesymptome	3. Dez. 08. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesympt.	Kaninchen
II	2. Dez. 08. Menschenserum <sup>1)</sup> : keine deutlichen Symptome 4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 3. Dez. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	3. Dez. 08. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesympt. 8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesymptome 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	Huhn
III	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : unerhebl. Symptome 3. Dez. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : keine Symptome 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt.	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen-serum <sup>2)</sup> : keine deutl. Symptome 5. Dez. 3 ccm Taubenserum <sup>1)</sup> : keine Symptome 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt.	3. Dez. 08. 5 ccm Kaninchen-serum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesympt. 8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	Schaf
IV	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben 4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : keine Symptome 8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesymptome 9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben 2. Dez. 08. 5 ccm Menschen-serum <sup>2)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen-serum <sup>2)</sup> : keine deutl. Symptome 9. Dez. 5 ccm Pferde-serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt	Pferd

V	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen- serum <sup>1)</sup> : keine deutl. Sym- ptome	3. Dez. 08. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesym- ptome	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome	Ziege
	5. Dez. an interkurrenter Krank- heit gestorben	5. Dez. 3 ccm Taubenserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	7. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	
		8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	9. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt	
		9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome		
VI	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen- serum <sup>1)</sup> : keine deutl. Sym- ptome	3. Dez. 08. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesympt.	Taube
	3. Dez. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome	5. Dez. 3 ccm Taubenserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesymptome	
	4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : unerhebliche Symptome		9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome	
	5. Dez. 3 ccm Taubenserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben			
VII	1. Dez. 08. 6 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen- serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt $\frac{3}{4}$ Stunde nach der Injektion	2. Dez. 08. 5 ccm Menschen- serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt $\frac{1}{4}$ Stunde nach der In- jektion	Mensch
	3. Dez. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome			
	4. Dez. 5 ccm Hühnerserum <sup>1)</sup> : keine Symptome			
	8. Dez. 5 ccm Ziegenserum <sup>1)</sup> : krank, aber keine deutlichen Anaphylaxiesymptome			
	9. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : leichte Symptome			
	12. Dez. 2 $\frac{1}{2}$ ccm Menschen- serum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt			

1) Während 15 Min. auf 56° erwärmt. 2) Während 10 Min. auf 56° erwärmt. 3) Während 30 Min. auf 56° erwärmt. 4) Nicht erwärmt. 5) Während 50 Min. auf 56° erwärmt.

wenige (4—6) Min. nach der Injektion erschlafften und schwach wurden, taumelten und sich an die Wände des Käfigs andrückten. Dieser Zustand dauerte bei den verschiedenen Tieren  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden. Keines der Tiere zeigte deutliche Anaphylaxiesymptome. I 1 starb 16 Stunden nach der Inj., die anderen blieben am Leben. V 2 schien am schwersten angegriffen.

Das Experiment ermöglichte nicht die Entscheidung, welcher Fetzen Kaninchenblut enthielt.

Am 4. Dez. wurden I 1, II 2, III 1, IV 1, V 3, VI 1, VII 1 je 5 ccm Hühnerserum (während 15 Min. auf  $56^{\circ}$  erwärmt) injiziert.

Bei I 1 und VI 1 zeigten sich ganz geringe Anaphylaxiesymptome (Jucken, einige Unruhe), welche jedoch 40 Min. nach der Inj. vollkommen nachgelassen hatten.

II 2: schwere Anaphylaxiesymptome (14 Min. nach der Inj.), große Unruhe und Jucken, dann und wann Zuckungen. 28 Min. nach der Inj. fällt das Tier um; taumelt im Bauer. Bleibt am Leben.

An den übrigen Tieren keine Symptome. Es wurden dann II 1 gleichfalls 5 ccm Hühnerserum injiziert; schon 5 Min. nach der Inj. große Unruhe, Schreien, Husten. 10 Min. nach der Inj. im Sterben, auf dem Rücken liegend, hochgradig dyspnoisch. 1 Stunde nach der Inj. erholt es sich; bleibt am Leben.

Auf Grund des Experimentes wurde auf dem Fetzen II Hühnerblut vermutet.

Am 5. Dez. wurden I 2, III 2, V 2, VI 2 je 3 ccm Taubenserum (während 15 Min. auf  $56^{\circ}$  erwärmt) injiziert.

Nur VI 2 zeigte Anaphylaxiesymptome: 7 Min. nach der Inj. große Unruhe, außerordentlich heftiges Jucken, das während 10 Min. unausgesetzt andauert. Dann und wann heftige Spasmen, 30 Min. nach der Inj. Dyspnoë, Taumeln. 55 Min. nach der Inj. tritt Besserung ein. Bleibt am Leben.

Danach wurden VI 1 ebenfalls 3 ccm Taubenserum injiziert. Das Tier verhält sich ganz wie VI 2. Bleibt am Leben.

Auf Grund des Experimentes wurde auf dem Fetzen VI Taubenblut vermutet.

Am 8. Dez. wurden I 2, II 3, III 3, IV 1, V 3, VI 3, VII 1 je 5 ccm Ziegenserum (während 15 Min. auf  $56^{\circ}$  erwärmt) injiziert.

10 Min. nach der Inj. sind die Tiere sämtlich sichtlich krank, drücken sich an die Wände an, krümmen sich bisweilen, spreizen die Hinterfüße ein wenig. Deutliche Anaphylaxiesymptome zeigt noch keines. Augenscheinlich ist die unmittelbare Giftwirkung des benutzten (zu wenig erwärmten) Ziegenserums nicht genügend aufgehoben. Sicherheitshalber wurden 5 ccm desselben Serums einem ganz frischen Meerschweinchen injiziert; es zeigt ganz die gleichen Symptome.

17 Min. nach der Inj. unterscheidet sich VI 3 deutlich von den übrigen Tieren, ist sehr schlaff, hochgradig dyspnoisch, fällt 20 Min. nach der Inj. auf die Seite um, stirbt  $1\frac{1}{4}$  Stunde nach der Inj. Die übrigen Tiere erholen sich nunmehr, nur III 3 ist merklich dyspnoisch und fällt ab und zu. Bleibt am Leben.

V 2 sowie einem frischen Tier zur Kontrolle werden 5 ccm Ziegen-serum (während 50 Min. auf 56° erwärmt) injiziert. Das frische Tier zeigt keine Symptome, V 2 typische schwere Anaphylaxiesymptome, bleibt  $\frac{1}{2}$  Stunde nach der Inj. während 10 Min. nach Luft schnappend, anscheinend in Sterben liegen, erholt sich dann und bleibt am Leben.

Auf Grund des Experimentes wurde auf dem Fetzen V Ziegenblut vermutet.

(Meerschweinchen III 3 war, wie V 3 und V 2, sehr krank, obwohl in erheblich geringerem Grad. Verwandtschaftsreaktion? Sensibilisierung mit Schafblut?)

Am 9. Dez. wurden I 1, II 3, III 1, III 2, IV 1, V 2, VI 3, VII 1 je 5 ccm Schafserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

I 1 und VII 1 zeigten unerhebliche bzw. leichte Anaphylaxiesymptome (leichtes Jucken und Unruhe, bei I 1 30 Min. nach der Inj. vollkommen gehoben, bei VII 1 etwas stärker).

III 1 und III 2 zeigen typische, schwere Anaphylaxiesymptome, welche 10—12 Min. nach der Inj. eintreten. Beide Tiere sterben unter heftigen Krämpfen, III 1 16 Min. nach der Inj., III 2 20 Min. nach der Inj.

Auch III 3, das am vorigen Tag auf Ziegen serum energisch reagiert hatte, wurden nun 5 ccm Schafserum injiziert: keine Symptome (Antianaphylaxie infolge vorausgehender Verwandtschaftsreaktion?)

Auf Grund des Versuches wurde auf dem Fetzen III Schafblut vermutet.

Das Ergebnis der in der Tabelle A dargestellten Versuche war also folgendes:

Auf Fetzen II	wurde Hühnerblut	vermutet
„ „ III	„ Schafblut	„
„ „ IV	„ Pferdeblut	„
„ „ V	„ Ziegenblut	„
„ „ VI	„ Taubenblut	„
„ „ VII	„ Menschenblut	„

Der Fetzen I mußte somit Kaninchenblut enthalten, was beim Injektionsversuch mit Kaninchenserum sich nicht feststellen ließ.

Das so erzielte Resultat war in voller Uebereinstimmung mit dem deponierten Verzeichnis.

Die ganze Untersuchung wurde dann wiederholt. Die Reihenfolge der Versuche war der bei der Untersuchung A befolgten analog. Weil die Untersuchung A ergeben hatte, daß die Erwärmung zum Zweck der Destruktion der unmittelbaren Giftwirkung des Serums für einige Sera (Ziegen-, Menschenserum) von zu kurzer Dauer gewesen war, wurde bei der Untersuchungsreihe B durchweg einer längeren Erwärmung Platz gegeben.

B. Tabelle über 21, als No. I 1, I 2, I 3, II 1, II 2, II 3 usw. bezeichnete, am 12. Dez. 1908 mit je 1 ccm wässerigem Extrakt aus als I—VII bezeichneten Blutflecken sensibilisierte Meerschweinchen. Die Reihenfolge der Versuche ist im übrigen der bei der Untersuchung A befolgten ganz analog. (Siehe nachstehende Zusammenfassung.)

Meerschweinchen No.	1	2	3
I	29. Dez. 08. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; bleibt am Leben 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; stirbt	30. Dez. 08. 5 ccm Pferdeserum <sup>1)</sup> ; keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> ; keine Symptome 5. Jan. 5 ccm Ziegenserum <sup>3)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; stirbt	29. Dez. 08. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> ; leichte Symptome 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> ; leichte Symptome 7. Jan. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>4)</sup> ; keine Symptome
II	29. Dez. 08. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> ; keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> ; leichte Symptome 4. Jan. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; bleibt am Leben 7. Jan. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> ; keine Symptome	30. Dez. 08. 5 ccm Pferdeserum <sup>1)</sup> ; keine Symptome 1. Jan. 09. 5 ccm Tauben- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; stirbt	31. Dez. 08. 3 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> ; unerhebliche Symptome 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>3)</sup> ; leichte Symptome
III	29. Dez. 08. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> ; keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> ; keine Symptome 4. Jan. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; bleibt am Leben 5. Jan. 5 ccm Ziegenserum <sup>3)</sup> ; unerhebliche Symptome	30. Dez. 08. 5 ccm Pferdeserum <sup>1)</sup> ; keine Symptome 1. Jan. 09. 5 ccm Tauben- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; bleibt am Leben 4. Jan. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; stirbt	31. Dez. 08. 3 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> ; keine Symptome 4. Jan. 09. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> ; <b>schwere Symptome</b> ; bleibt am Leben 7. Jan. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> ; keine Symptome



IV	29. Dez. 08. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : keine Symptome 31. Dez. 08. 3 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome 4. Jan. 09. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> : leichte Symptome 7. Jan. 09. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome	30. Dez. 08. 5 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome 1. Jan. 09. 5 ccm Tauben- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome 7. Jan. 09. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : leichte Symptome	31. Dez. 08. 3 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> : unerhebliche Sym- ptome 7. Jan. 09. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome	Kaninchen
	29. Dez. 08. 5 ccm Schaf- serum <sup>1)</sup> : schwere Sym- ptome; stirbt	29. Dez. 08. 5 ccm Schaf- serum <sup>1)</sup> : schwere Sym- ptome; stirbt	30. Dez. 08. 5 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : keine Symptome 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> : schwere Symptome; blieb am Leben, aber starb später	Schaf
VI	29. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : unerhebliche Symptome 4. Jan. 09. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> : leichte Symptome 7. Jan. 09. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome 18. Jan. 5 ccm Pferdeserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; bleibt am Leben	30. Dez. 08. 5 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : schwere Sym- ptome; stirbt	2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> : unerhebliche Symptome 18. Jan. 09. 5 ccm Pferdeserum <sup>1)</sup> : schwere Symptome; stirbt	Pferd
VII	29. Dez. 5 ccm Schafserum <sup>1)</sup> : unerhebliche Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : schwere Sym- ptome; bleibt am Leben 4. Jan. 09. 4 ccm Hühner- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome 7. Jan. 09. 5 ccm Kaninchen- serum <sup>1)</sup> : unerhebliche Sym- ptome	30. Dez. 08. 5 ccm Pferde- serum <sup>1)</sup> : keine Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : schwere Sym- ptome; bleibt am Leben 5. Jan. 09. 5 ccm Ziegen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome	31. Dez. 08. 3 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : leichte Symptome 2. Jan. 09. 5 ccm Menschen- serum <sup>2)</sup> : keine Symptome	Mensch

1) Während 15 Minuten auf 56° erwärmt.

2) Während 30 Minuten auf 56° erwärmt.

3) Während 45 Minuten auf 56° erwärmt.

### Zusammenfassung der Untersuchung B.

Am 29. Dez. 1908 wurden I 1, II 1, III 1, IV 1, V 1, VI 1, VII 1 je 5 ccm Schafserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

VII 1 und VII 1 zeigen unerhebliche Anaphylaxiesymptome.

II 1, III 1, IV 1: keine Symptome.

I 1 und V 1: schwere Symptome. I 1 bleibt am Leben, V 1 stirbt 62 Min. nach der Inj.

Demnächst wurden I 3 und V 2 je 5 ccm Schafserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert:

I 3: leichte Anaphylaxiesymptome. V 2: schwere Anaphylaxiesymptome. Stirbt 70 Min. nach der Inj.

Auf Grund des Versuches wird auf dem Fetzen V Schafblut vermutet, auf dem Fetzen I vermutlich Ziegenblut (Verwandtschaftsreaktion).

Am 30. Dez. wurden I 2, II 2, III 2, IV 2, V 3, VI 2, VII 2 je 5 ccm Pferdeserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

I 2, II 2, III 2, V 3, VII 2: keine Symptome.

IV 2: unerhebliche Symptome.

VI 2: schwere Symptome. Stirbt 50 Min. nach der Inj.

Auf Grund des Versuches wird auf dem Fetzen VI Pferdeblut vermutet.

Am 31. Dez. wurden II 3, III 3, IV 3, VII 3 je 3 ccm Menschenserum (während 30 Min. auf 56° erwärmt) injiziert. II 3: unerhebliche Symptome. III 3: keine Symptome. IV 3: leichte Symptome (starkes Jucken, einige Schlaffheit des Hinterleibes). VII 3: leichte Symptome (Jucken, Schlaffheit). IV 3 schien etwas mehr angegriffen als VII 3, aber keines der Tiere wies schwere Anaphylaxiesymptome auf.

IV 1 wurden danach 3 ccm Menschenserum injiziert: starkes Jucken, sonst keine Symptome. Weil nicht mehr Menschenserum vorhanden war, mußte der Versuch als unbefriedigend gelten und wurde am 2. Jan. 1909 fortgesetzt.

Am 2. Jan. 1909 wurden I 2, II 1, III 1, IV 2, V 3, VI 3, VII 1, VII 2, VII 3 je 5 ccm Menschenserum (während 30 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

I 2, III 1, V 3: keine Symptome. II 1, IV 2, VI 3: leichte Symptome. VII 1 und VII 2: schwere Symptome (besonders VII 2, welches während 10 Min. wie sterbend auf der Seite lag); beide Tiere bleiben am Leben.

VII 3: keine Symptome (hatte schon früher, 31. Dez. Menschenserum bekommen).

Auf Grund des Versuches wurde auf dem Fetzen VII Menschenblut vermutet.

Am 1. Jan. 1909 wurden II 2, III 2, IV 2 je 5 ccm Taubenserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

IV 2: keine Symptome.

II 2: schwere Symptome. Stirbt 50 Min. nach der Inj.

III 2: schwere Symptome. Bleibt am Leben.

Auf Grund des Versuches wurde auf dem Fetzen II Taubenblut vermutet (III vermutlich Hühnerblut; Verwandtschaftsreaktion).

Am 4. Jan. 1909 wurden II 1, III 1, III 2, III 3, IV 1, VI 1, VII 1 je 4 ccm Hühnerserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

IV 1 und VI 1: leichte Symptome. VII 1: unerhebliche Symptome.

II 1: schwere Symptome (große Schwäche, starke Dyspnoë, taumelt, ohne zu fallen).

III 1: schwere Symptome, bleibt am Leben. III 2: schwere Symptome; stirbt 48 Min. nach der Inj.

III 3: schwere Symptome, bleibt am Leben.

Auf Grund des Versuches wurde auf dem Fetzen III Hühnerblut vermutet.

Am 5. Jan. wurden I 1, I 2, I 3, II 3, III 1, IV 3, V 3, VI 3, VII 2 je 5 ccm Ziegenserum (während 45 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

II 3 und VII 2: leichte Symptome. III 1, IV 3, VI 3: unerhebliche Symptome.

I 1: schwere Symptome; stirbt 2 Stunden nach der Inj. I 2: schwere Symptome; stirbt 27 Min. nach der Inj.

V 3: leichte Symptome (hatte am 29. Dez. Schafserum bekommen: leichte Symptome).

V 3: schwere Symptome; bleibt am Leben.

Auf Grund des Versuches wurde auf dem Fetzen I Ziegenblut vermutet.

Am 7. Jan. wurden I 3, II 1, III 3, IV 1, IV 2, IV 3, VI 1, VII 1 je 5 ccm Kaninchenserum (während 15 Min. auf 56° erwärmt) injiziert.

I 3, II 1, III 3, IV 1: keine Symptome.

IV 3, VI 1, VII 1: unerhebliche Symptome.

IV 2: leichte Symptome.

Der Versuch ermöglichte nicht die Entscheidung, welcher Fetzen Kaninchenblut enthielt.

Das Ergebnis der in der Tabelle B dargestellten Versuche war also folgendes:

Auf dem Fetzen	I	wurde	Ziegenblut	vermutet
"	"	"	II	"
"	"	"	III	"
"	"	"	V	"
"	"	"	VI	"
"	"	"	VII	"

Wie bei der Untersuchung A wird per exclusionem auf dem Fetzen IV Kaninchenblut vermutet.

Die Versuche mit Kaninchenserum hatten keine solchen Resultate ergeben, aus denen allein mit Wahrscheinlichkeit für IV auf Kaninchenblut zu schließen wäre.

Obiges Ergebnis war in voller Uebereinstimmung mit der deponierten Liste über die Art der Blutflecken.

Es war somit die Möglichkeit erwiesen, mit mehrere Monate alten Blutflecken Meerschweinchen so zu sensibilisieren, daß sie nach 2—3 Wochen mit ausgesprochen anaphylaktischen Symptomen reagierten, sofern die dem Blut des Fleckes homologe Serumart injiziert wird; daß sie dagegen nur in geringem Maße oder gar nicht anaphylaktisch reagieren, wenn die zur Anwendung gelangte Serumart heterolog ist.

Ferner ergab sich ein deutlicher Unterschied der Wirkung des Serums, je nachdem es einer Tierart entnommen war, welche derjenigen, der das Blut des Fleckens entstammt, phylogenetisch nahe oder ferner steht. Es ließ sich hier dieselbe „Verwandtschaftsreaktion“ wahrnehmen, wie bei der Reaktion der biologischen Präzipitatabildung.

Daß nur ein Teil der sensibilisierten Tiere auf heterologe Sera reagierten, ist vermutlich individuellen Eigentümlichkeiten der einzelnen Meerschweinchen zuzuschreiben, wie man denn auch in solchen die Ursache der Tatsache suchen wird, daß in gleicher Weise sensibilisierte und danach mit homologem Serum behandelte Tiere bald sterben, bald die Injektion überleben.

Für die Möglichkeit der praktischen Verwendung der Erscheinung der Anaphylaxie in der Gerichtsmedizin ist der Umstand wichtig, daß bei meinen Versuchen kein Tier, dem ein heterologes Serum injiziert war, jemals schwere Anaphylaxiesymptome aufwies (abgesehen von der Verwandtschaftsreaktion). Andererseits hat ein homologes Serum an den Versuchstieren fast stets schwere Symptome, eventuell den Tod<sup>1)</sup> hervorgerufen; ausgenommen sind folgende Fälle:

1) No. III 3 bei der Untersuchungsreihe A, mit Schafblut sensibilisiert, 22 Tage später 5 ccm Schafserum injiziert: keine Symptome. Dabei ist aber zu bemerken, daß

1) 51 Meerschweinchen wurde bei obigen Versuchen Serum injiziert, das dem sensibilisierenden Blut homolog war. Von diesen 51 Tieren

dem Tier tags vorher 5 ccm Ziegenserum gegeben worden war, das schwere Anaphylaxiesymptome hervorgerufen hatte.

2) No. I 3 der Untersuchungsreihe B, mit Ziegenblut sensibilisiert, 24 Tage später 5 ccm Ziegenserum injiziert: leichte Symptome. Indessen waren dem Tier 6 Tage früher 5 ccm Schafserum injiziert worden, welches leichte Anaphylaxiesymptome hervorrief. Es läßt sich daher denken, daß diese beiden Tiere infolge der früheren Injektion<sup>1)</sup> refraktär geworden sind, und deshalb auf das homologe Serum nicht (bezw. nur schwach) reagierten.

3) No. VII 3 bei der Untersuchung B, mit Menschenblut sensibilisiert, 19 Tage später 3 ccm Menschenserum injiziert: leichte Symptome.

4) Eine Ausnahme machen ferner die mit Kaninchenblut sensibilisierten Meerschweinchen (7), indem keines dieser Tiere mit schweren Anaphylaxiesymptomen auf eine folgende Injektion von Kaninchen serum reagierte. Diese Meerschweinchen wiesen entweder keine oder nur unerhebliche, bezw. leichte Symptome auf. Bei der letzteren Untersuchung (B) stellten sich freilich nach der Injektion von Kaninchen serum bei 3 mit Kaninchenblut sensibilisierten Meerschweinchen etwas stärkere Symptome ein, als bei den anderen, mit anderen Arten von Blut sensibilisierten Tieren; aber der Unter-

starben 22. Die Verteilung ist aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich. Alle Tiere starben im Verlauf von 2 Stunden nach der Injektion.

Sensibilisierung mit Blutfleck von	Injektion des homologen Serums	
	Anzahl	Gestorben
Kaninchen	7	0
Pferd	9	5
Mensch	9	5
Huhn	8	2
Taube	3	1
Ziege	7	5
Schaf	7	4
Ochse	1	0
Summa	51	22

1) Meerschweinchen, die eine homologe Anaphylaxieerkrankung überleben, sind mindestens mehrere Wochen refraktär (s. unten).

schied war zu geringfügig, als daß man ihm in der Praxis irgendwelche Bedeutung beimessen durfte.

Im allgemeinen wird es daher nicht möglich sein, mit Hilfe der Anaphylaxie festzustellen, ob ein Blutfleck durch Kaninchenblut entstanden ist, wenn Meerschweinchen als Versuchstiere verwendet werden.

Interessant ist, daß nur die homologe Anaphylaxie bei den mit Kaninchenblut sensibilisierten Meerschweinchen so wenig deutlich war, die heterologe Anaphylaxie dagegen bei diesen Tieren nicht geringer war, als bei anderen, mit anderen Blutarten sensibilisierten.

Es ist oben als eine Schwierigkeit hervorgehoben worden, daß ein sensibilisiertes Tier, welches auf die Injektion eines dem homologen phylogenetisch verwandten Serums anaphylaktisch reagiert hat, dadurch mehr oder weniger refraktär werden kann gegen spätere Injektion des homologen Serums. Daß ein sensibilisiertes Tier, welches die Injektion homologen Serums überlebt, auf längere Zeit in einen Zustand der „Immunität“ oder „Antianaphylaxie“ übergeht, ist ja nämlich eine bekannte Tatsache. Daß indessen die Injektion von dem homologen verwandten Serumarten dessen Symptome auslösende Wirkung jedenfalls nicht immer aufhebt, ist durch meine Versuche klar erwiesen. Ich verweise dafür auf:

Meerschweinchen VI 1 bei Untersuchungsreihe A: sensibilisiert mit Taubenblut am 17. Nov. 1908; Injektion von Hühnerserum am 4. Dez. (17 Tage nach der Sensib.): unerhebliche Symptome. Injektion von Taubenserum am 5. Dez. (18 Tage nach der Sensib.): schwere Symptome.

Meerschweinchen III 2 bei der Untersuchungsreihe B: sensibilisiert mit Hühnerblut am 12. Dez. 1908; Injektion von Taubenserum am 1. Jan. 1909 (20 Tage nach der Sensib.): schwere Symptome. Injektion von Hühnerserum am 4. Jan. (23 Tage nach der Sensib.): schwere Symptome. Starb.

Meerschweinchen I 1 bei der Untersuchungsreihe B: sensibilisiert mit Ziegenblut am 12. Dez. 1908; Injektion von Schafserum am 29. Dez. (17 Tage nach der Sensib.): schwere Symptome. Injektion von Ziegenserum am 5. Jan. 1909 (24 Tage nach der Sensib.): schwere Symptome. Starb.

Die Injektion einer ganzen Reihe von heterologen Seris, die der Art des sensibilisierenden Blutes nicht nahe verwandt

sind, schwächen, wie es scheint, die Anaphylaxie für das homologe Serum nicht wahrnehmbar ab; ich verweise dafür besonders auf:

Meerschweinchen VII 1 der Untersuchungsreihe A: das Tier war mit Menschenblut am 17. Nov. 1908 sensibilisiert, worauf ihm in den Tagen vom 1. Dez. bis 9. Dez. fünf verschiedene Serumarten (Pferd, Kaninchen, Huhn, Ziege, Schaf) injiziert wurden. 12. Dez. (25 Tage nach der Sensib.) Injektion von Menschenserum: schwere Symptome. Starb.

Ganz ähnliche Verhältnisse zeigen sich z. B. bei V 3 in der Untersuchungsreihe A, VI 1 und VI 2 in der Untersuchungsreihe B.

Besonders betonen möchte ich, daß nach meiner Ansicht die auf der Anaphylaxie beruhende Methode zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut, wenn sie sich als praktisch verwendbar erweist, doch keineswegs den Wert der Uhlenhuthschen Präzipitinmethode verringern wird. Wenn aber, wie ich glaube, das neue Verfahren sich als brauchbar erweist, so dürften vielleicht viele es als eine erfreuliche Sicherung empfinden, wenn mehrere Untersuchungsmethoden zur gegenseitigen Kontrolle in Anwendung gebracht werden können, wo es sich um die Entscheidung von Fragen handelt, die verhängnisvoll für das Wohl und Weh von Menschen zu sein pflegen. Neisser und Sachs' scharfsinnige Anwendung des Phänomens der Komplementablenkung als Prinzip ist technisch kompliziert und seiner Natur nach vermutlich mit der Präzipitinmethode eng verwandt. Ich glaube daher, daß eine auf Tierexperimente gestützte und auf ein ganz anderes Prinzip, als das Uhlenhuthsche Präzipitinverfahren, aufgebaute Methode zum Nachprüfen nützlich sein wird.

Eine bedeutsame Frage ist die, wie wenig Blut genügt, um das Verfahren zuverlässig ausführen zu können. Wie schon erwähnt, wollen Rosenau und Anderson das Eintreten typischer Anaphylaxie schon nach Sensibilisierung mit 0,000001 ccm Pferdeserum beobachtet haben, doch dürfte das als ein Ausnahmefall zu betrachten sein.

Bei der Mehrzahl meiner Versuche wurde vermutlich ca.  $\frac{1}{100}$  ccm Blut gebraucht. Für Menschenserum habe ich folgende kleine Untersuchung angestellt:

Meerschweinchen	Sensibilisiert mit Menschenserum	Symptome nach Injektion (14 Tage später) von 5 ccm Menschenserum (während 30 Min. auf 56° erwärmt)
1	0,01 ccm	schwere Symptome; starb
2	0,005 "	" "
3	0,002 "	" " "
4	0,001 "	" "
5	0,0001 "	leichte "

Nach dem Ergebnis dieser Untersuchung scheint  $\frac{1}{100}$  ccm eine reichliche Dosis zur Sensibilisierung zu sein. Um die Bedeutung der Größe der Symptome auslösenden Dosis auszuprobieren, wurde folgender Versuch gemacht:

Meerschweinchen mit $\frac{1}{200}$ ccm Menschenserum sensibilisiert No.	Quantum bei 2" Injektion (während 30 Min. auf 56° erwärmt)	Symptome	Tage nach der Sensibilisierung
1	5 ccm	schwere	14
2	5 "	"	14
3	2 "	"	14
4	2 "	leichte	14
5	1 "	schwere	14
6	1 "	"	14
7	$\frac{1}{8}$ "	leichte	14
8	$\frac{1}{8}$ "	"	14
9	$\frac{1}{10}$ "	keine	14
10	$\frac{1}{10}$ "	unerhebliche?	14
11	5 "	schwere; stirbt	16
12	1 "	leichte	16
13	5 "	schwere	16
14	1 "	schwere; stirbt	16

Den Nummern 1—10 wurde bei der zweiten Injektion Serum gegeben von Blut, das unter sterilen Kautelen bei Entbindungen gewonnen ist (es kann daher Sekret aus den Geburtsteilen beigemischt gewesen sein). No. 11—12 wurde Serum eines neugeborenen Kindes (vom Nabelstrang gewonnen) gegeben, No. 13—14 Serum eines Erwachsenen (durch Aderlaß).

Aus obiger Tabelle scheint sich zu ergeben, daß es kaum von größerer Bedeutung ist, ob 5 ccm oder 1 ccm zum Auslösen der Anaphylaxiesymptome benutzt werden. Daß die



Natur des benutzten Menschenserums (Placentarblut, bei Entbindung oder Aderlaß gewonnen) Einfluß hat auf den Stärkegrad der Symptome, ist wohl nicht wahrscheinlich. Von den Tieren, denen bei Entbindung gewonnenes Blut injiziert wurde (1—10), starb bei obiger Untersuchung freilich keines, was doch wohl nur zufällig ist; mehrere von ihnen waren so krank, daß sie anscheinend im Sterben begriffen waren. Dazu wurde bei den früher besprochenen Versuchen mit Anaphylaxie für Menschenserum ebenfalls bei Entbindungen gewonnenes Blut verwendet (von 9 derart behandelten Tieren starben 5). Da indessen immer die Gefahr besteht, daß das bei Entbindungen gewonnene Blut durch Beimischung von Fruchtwasser etc. verdünnt ist, so dürfte es sich empfehlen, wo möglich immer durch Aderlaß oder vom Nabelstrang gewonnenes Blut zu benutzen.

Interessant ist, daß das Serum neugeborener Kinder keine geringere anaphylaxieauslösende Wirkung zeigte als das Erwachsener, dabei aber, im Gegensatz zu dem älterer Individuen, eine nur schwache unmittelbare Giftwirkung auf Meerschweinchen zu haben scheint. 3 frische Meerschweinchen, denen je 6 ccm nicht erwärmtes Serum (Placentarblut) gegeben wurden, zeigten wenigstens keine krankhaften Symptome. Ein viertes Tier, welches 10 ccm bekam, war etwas stumpf, zeigte aber sonst nichts. Vielleicht ist dieses mit der Tatsache in Verbindung zu bringen, daß dem Serum neugeborener Kinder natürliche Hämolysine (Ambozeptoren) fehlen.

Bei der Anwendung der Methode auf einen gegebenen Fall dürfte etwa folgendes Verfahren zu empfehlen sein: Auszug aus dem Blutfleck mit 0,9-proz. Kochsalzlösung. Sensibilisierung mit kleinem Quantum, das ca.  $\frac{1}{100}$  ccm Blut nicht übersteigt. Nach 14—16 Tagen Versuch einer Injektion des vermuteten Serums. Das Serum sollte vorher auf 56° erwärmt gewesen sein, weil dann die Anaphylaxiesymptome weit schärfer hervortreten. Die Erwärmung soll nicht länger dauern, als notwendig, in dieser Hinsicht aber besteht ein Unterschied zwischen den verschiedenen Sera. Hinsichtlich der von mir benutzten Sera glaube ich, 15—20 Minuten als genügend betrachten zu dürfen für Pferd, Kaninchen, Schaf, 30 Minuten für Mensch, Taube, Huhn, 45 bis

60 Minuten für Ziege und Ochs. Es ist indessen wohl recht wahrscheinlich, daß sich noch ziemlich bedeutende individuelle Schwankungen werden nachweisen lassen.

Es ergibt sich von selbst, daß man auf jeden Fall mehrere Meerschweinchen anwenden und die Wirkung verschiedener Serumarten untersuchen muß. Nur schwere Anaphylaxiesymptome können dafür als Ausdruck gelten, daß der sensibilisierende Extrakt und das symptomauslösende Serum vom heterologen Blut herrühren.

Wie es sich mit sehr alten Blutspuren und mit verfaultem Blut verhält, das zu untersuchen hatte ich noch keine Gelegenheit.

Auch habe ich keine andere als die intraperitoneale Applikation des Serums versucht und weiß daher noch nicht, ob sich vielleicht bei Anwendung intracerebraler Injektion Vorteile erzielen lassen. Vorläufig am wichtigsten war mir die systematische Durchführung eines Versuches bei einfacher, gleichartiger Anordnung.

Als meine Arbeit schon fast zum Abschluß gebracht war, hat H. Pfeiffer<sup>1)</sup> einige Untersuchungen veröffentlicht, deren Leitmotive ähnliche waren, wie die meiner Arbeit zugrunde liegenden. Pfeiffer denkt an die Möglichkeit, die Anaphylaxie als Mittel zur Differenzierung von Eiweißarten in der forensischen Praxis anzuwenden, doch hat er mit der von ihm angewandten Anordnung der Versuche (Sensibilisierung mit großer Serumdosis [5 ccm] und wiederholter Injektion gleichen Quantums, oder Sensibilisierung mit kleiner Dosis [0,2—0,00002 ccm] und darauf folgender Injektion von 0,5 ccm Serum) das typische Bild der Anaphylaxie nicht hervorzubringen vermocht. Dagegen hat er, wo zur Sensibilisierung und der darauf folgenden Injektion das gleiche Serum benutzt wurde, an den Versuchstieren (Meerschweinchen) ein konstantes Sinken der Temperatur festgestellt, welche nicht beobachtet wurde, wenn das zur ersten und zweiten Injektion benutzte Serum heterolog war. Die bislang nur wenig zahlreichen und wenig variierten Versuche sind nur mit Serum,

---

1) H. Pfeiffer, Ueber das verschiedene Verhalten der Körpertemperatur nach Injektion und nach Reinjektion von artfremdem Serum. Wien. klin. Wochenschr., 1909 No. 1.

nicht mit Extrakt aus Blutflecken angestellt worden. Auf alle Fälle wird es doch gewiß vorzuziehen sein, ein wohlcharakterisiertes Krankheitsbild als Grundlage zu wählen, nicht ein einziges, wenig charakteristisches Symptom, wie das Sinken der Temperatur eins ist.

#### **Zusammenfassung.**

Es besteht eine scharf ausgeprägte quantitative Spezifizität der Serumanaphylaxie, so daß das mit dem sensibilisierenden Serum homologe Serum schwere Anaphylaxiesymptome hervorruft; dem homologen verwandte Sera rufen etwas weniger schwere Symptome hervor, und ferner stehende heterologe Sera rufen leichte oder keine Symptome hervor.

Kaninchenserum ruft nur sehr geringe Anaphylaxie bei Meerschweinchen hervor.

Man kann, wie zuerst von Doerr und Raubitschek mit Aalserum nachgewiesen, durch Erwärmung die unmittelbare Giftwirkung des Serums von der Anaphylaxie auslösenden Wirkung trennen, indem Erwärmung von kurzer Dauer auf 56° erstere Eigenschaft destruiert, letztere dagegen nicht wahrnehmbar dadurch beeinträchtigt wird.

Die Erscheinung der Anaphylaxie ist als Prinzip einer forensischen Methode zur Unterscheidung von Blutarten verwendbar, indem man mittels wässerigen Extraktes aus dem gegebenen Blutfleck Meerschweinchen hochgradig anaphylaktisch für das homologe Serum machen kann.

Auch mehrfach wiederholte Injektion heterologen Serums hebt die Anaphylaxie des sensibilisierten Meerschweinchens für das homologe Serum nicht auf. Eine Ausnahme machen möglicherweise solche Sera, die dem homologen phylogenetisch nahestehen, indem sie vielleicht zuweilen, aber nicht immer, die Anaphylaxie auslösende Wirkung einer folgenden Injektion des homologen Serums aufheben können.

Serum neugeborener Kinder scheint gleich starke Anaphylaxie auslösende Wirkung zu besitzen, wie das Serum älterer Individuen, dagegen nur geringe unmittelbare Giftwirkung.

---

Für die Erlaubnis, meine Versuche im staatlichen Serum-institut auszuführen, sowie für Rat und Beistand, der mir während der Arbeit zuteil wurde, spreche ich Herrn Direktor Dr. Th. Madsen meinen besten Dank aus.

Kopenhagen, 15. Februar 1909.

---

### **Bemerkung zu vorstehender Arbeit von O. Thomsen.**

Von P. Uhlenhuth.

Zu den interessanten Untersuchungen von Thomsen möchte ich bemerken, daß auch ich mich seit einiger Zeit mit in Rede stehender Frage beschäftigt habe. Auf Grund meiner Erfahrungen habe ich bereits in der Berlin. militär-ärztlichen Gesellschaft am 14. Dezember 1908 (s. Deutsch. militärärztl. Zeitschr., 1909, No. 2) mitgeteilt, „daß die anaphylaktische Reaktion auch eine praktische Bedeutung hat; sie kann ebenso wie die Präzipitationsreaktion zur Unterscheidung von Eiweiß, Milch, Blut usw. verschiedener Tierarten herangezogen werden. Auch forensisch könnte die Reaktion zur Diagnose von Blutflecken, ferner zum Nachweis von Pferdefleisch dienen. Jedoch ist sie viel zu umständlich gegenüber der einfachen und viel exakter arbeitenden Präzipitationsmethode. Bei der Anaphylaxie spielt die Individualität der Tiere eine zu große Rolle, es werden nicht alle Tiere überempfindlich. Interessant ist die Tatsache, daß Einspritzung verwandter Blutarten (Pferd, Esel — Mensch, Affe) gegeneinander anaphylaktisch macht.“ Ich habe an gleicher Stelle über die Linsen-anaphylaxie berichtet, die nach meinen mit Dr. Andrejew ausgeführten Untersuchungen parallel verläuft mit der Präzipitinreaktion, da sie auch keine Differenzierung der Linsen verschiedener Tiere gestattet (Arb. aus dem Kais. Gesundheitsamt, Bd. 30, 2). Gleiche Ergebnisse erzielten bekanntlich Kraus, Doerr und Sohma unabhängig von uns.

Unser Urteil über die forensische Bedeutung der Anaphylaxie stützt sich auf Untersuchungen, die ich zusammen mit Haendel angestellt habe. Angetrocknete Blutflecken konnten, wie das von vornherein zu erwarten war, ihrer Herkunft nach durch die Anaphylaxiereaktion bestimmt werden. Doch dürfte in diesen Fällen die Präzipitinreaktion in allen Fällen ausreichend und vorzuziehen sein; die anaphylaktische Reaktion ist ein schwer zu deutender Symptomenkomplex, der Zweifeln großen Spielraum läßt. Einen Wert für die forensische Praxis können wir aber in den Fällen erblicken, in denen die Präzipitinreaktion versagt, z. B. bei gekochtem Eiweißmaterial, wie gekochtem Fleisch. Hier gelang es uns, bei 50 Minuten lang gekochtem zerkleinerten Pferdefleisch (Wurst), das keine sichtbare Präzipitinreaktion mehr zeigte, durch die Anaphylaxie bei Meerschweinchen die Herkunft des Fleisches nachzuweisen, indem wir die Tiere mit nativem Pferdeserum nachimpften. Das ist erklärlich, da minimale Spuren nativen Eiweißes noch ausreichen können, um die Tiere zu sensibilisieren — im gekochten Fleisch sind meist noch Spuren davon enthalten — und da ferner auch stark erhitztes Eiweißmaterial nach den Untersuchungen von Besredka, Kraus und Volk u. a. imstande ist, gegen natives Eiweiß überempfindlich zu machen. Ob in diesen Fällen trotz Erhitzung nicht doch noch Spuren nativen Eiweißes übrig geblieben sind, dürfte schwer zu erweisen sein.

Für die Fleischschau käme die Anaphylaxie auch für den Nachweis von gekochtem Fischfleisch in Frage. Für die Unterscheidung von nicht gekochtem Material (Fische, Krebse, Kaviar etc.) genügt die Präzipitinreaktion nach neuem mit Einecker durchgeführten Versuche.

Bei Untersuchung einer ägyptischen Mumie mittels der Anaphylaxiereaktion hatten wir ein negatives Resultat.

Jedenfalls möchten wir auch hier, was die forensische Beurteilung betrifft, zu großer Vorsicht mahnen, da der Ausfall der Anaphylaxieversuche nicht immer eindeutig ist. Stets müssen zahlreiche Tiere und mehrere Kontrollen zur Entscheidung herangezogen werden. Wir werden in einer ausführlichen Arbeit auf diese Untersuchungen zurückkommen.

[Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität Prag:  
Vorstand: Prof. F. Hueppe.]

### **Beobachtungen über die Bindung bakteriolytischer Immunkörper an Vibrionen.**

Von Prof. Dr. Oskar Bail und Dr. Kyuzo Tsuda.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. März 1909.)

In einer vor kurzem veröffentlichten Reihe von Versuchen wurde über die Abspaltung von bakteriolytischen Immunkörpern, die bereits an Vibrionen gebunden waren, berichtet. Eine solche findet, übereinstimmend mit Versuchsergebnissen von Pfeiffer und Friedberger, im Meerschweinchenkörper statt, außerhalb des Tieres kann man sie durch Digestion sensibilisierter Vibrionen in Kochsalzlösung, am besten bei einer Temperatur von 42—45° hervorrufen, wodurch ältere Versuche von Landsteiner und Jagic bestätigt wurden. Die weitere Verfolgung des Themas ergab eine Reihe neuer Beobachtungen, über welche nachstehend berichtet werden soll.

Es war als notwendig erkannt worden, sensibilisierte Vibrionen in ein anderes Medium zu bringen, um eine Abspaltung der bereits gebundenen Immunkörper herbeizuführen, wobei die Temperatur eine wichtige Rolle spielt. Aber nicht jedes Medium bewirkt solches: während man in physiologischer Kochsalzlösung und in aktivem oder inaktivem Meerschweinchen-serum mit Leichtigkeit die bereits gebundenen Immunkörper in Freiheit setzen kann, bleiben sie in inaktivem Rinderserum nicht nur fest gebunden, sondern dieselben Vibrionen, welche sonst Immunkörper abgeben, nehmen noch neue dazu auf. Es stellte sich bald heraus, daß nicht nur inaktives Rinderserum, sondern noch eine ganze Reihe anderer normaler Sera sich analog verhalten.

Bringt man hingegen die mit inaktivem Rinderserum sensibilisierten Vibrionen in mit Kochsalzlösung verdünntes Immunserum, so wird der immunisatorisch erzeugte Cholera-ambozeptor nicht nur nicht aufgenommen, sondern es findet in vielen Fällen wahrscheinlich sogar eine Abgabe des früher

aufgenommenen Rinderimmunkörpers statt. Das wird aber sofort anders, sobald man das Immunserum nicht mit Kochsalzlösung, sondern mit einem inaktiven Serum verdünnt.

I. Versuch. Je 2 Kulturen Cholera<sup>1)</sup> werden mit 20 ccm inaktivem (56°) Rinder- und Pferdeserum 1<sup>h</sup> bei 42° gehalten, in je 3 Teilen gewaschen und dann, wie folgt, weiterbehandelt:

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm inakt. (1/2<sup>h</sup> 56°) Rinderserum
- 2) " " " " + 1 " " " " " Pferdeserum
- 3) " " " " + 1 " " NaCl-Lösung
- 4) " Pferdeserum " " + 1 " " inakt. (1/2<sup>h</sup> 56°) Rinderserum
- 5) " " " " + 1 " " Pferdeserum
- 6) " " " " + 1 " " NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Aufenthalte bei 42° werden alle Proben zentrifugiert, und die klaren Flüssigkeiten werden mit einem Zusatz von Meerschweinchenkomplement untersucht.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0	0	0	0
" No. 2	0	0	0	0
" No. 3	+++	+++	fast +++	++
" No. 4	0	0	0	0
" No. 5	0	0—+	0	0
" No. 6	+++	fast +++	fast +++	++
" inaktiv. Rinderserum	+++	+++	fast +++	+±
" " Pferdeserum	+++	+++	fast +++	+++—++
Meerschweinchenkomplement	0—+			

II. Versuch. 4 Kulturen Cholera werden zuerst 1/2<sup>h</sup> bei 42° mit 20 ccm inaktivem (1/2<sup>h</sup> 56°) Rinderserum behandelt, dann abzentrifugiert und abermals mit ebensoviel inaktivem Rinderserum 1/2<sup>h</sup> bei 42° belassen. Hierauf wird die Bakterienmenge in 4 gleiche Teile geteilt und gewaschen. Ganz genau so werden 4 andere Kulturen mit inaktivem Pferdeserum behandelt.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm inaktives Rinderserum + 0,0025 ccm Immunserum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm inaktives Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung

1) Der Cholerastamm ist der gleiche, der bei unseren früheren Versuchen (diese Zeitschrift, Bd. 1, No. 4) verwendet wurde. Er war im Laufe der Zeit noch empfindlicher für Bakteriolyse geworden, so daß nur sehr wenig Meerschweinchenkomplement (ganz junge Tiere!) als Komplement verwendet wurde, nämlich 0,05 ccm einer Verdünnung von 0,4 ccm Serum mit 0,6 ccm NaCl-Lösung für jede Probe. Der Kürze wegen ist das Resultat der Versuche in Zeichen wiedergegeben, wobei bedeutet: +++ vollständige Granulabildung, ++ überwiegende Granulabildung, +± ungefähr gleich viel Granula und Vibrionen, + die Vibrionen überwiegen. Zwischenstufen sind ebenfalls angegeben, z. B. +++—+++, d. h. nur sehr wenige Vibrionen noch erhalten.

- 3) mit Rinderserum sensibilisierten Vibrionen + 0,75 ccm NaCl-Lösung  
+ 0,0025 ccm Immunserum  
4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung.  
5—8) genau so mit mit Pferdeserum sensibilisierten Vibrionen.

Nach 1<sup>h</sup> Aufenthalt bei 42° werden die Proben abzentrifugiert und mit Meerschweinchenkomplement zusammen verwendet.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+	0	0
„ No. 2	0	0	0
„ No. 3	+++	fast +++	fast +++
„ No. 4	+++	fast +++	+++—++
„ No. 5	+	0	0
„ No. 6	+—0	0	0
„ No. 7	+++	+++	+++—++
„ No. 8	+++	fast +++	+++—++
Kontrolle von No. 1	+++	+++	+++
„ „ No. 2	+++	+++	fast +++
„ „ No. 5	+++	+++	+++—++
„ „ No. 6	+++	fast +++	++
„ „ No. 3 u. 7	+++	+++	+++—±
Meerschweinchenkomplement 0			

III. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden zweimal nacheinander je  $\frac{3}{4}$  h bei 42° mit je 40 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, in 8 gleiche Teile geteilt, zentrifugiert und gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,05 ccm Immunserum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Schafserum + 0,05 ccm Immunserum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Schafserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 5) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Schweineserum + 0,05 ccm Immunserum
- 6) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm inakt. (56°) Schweineserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 7) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,95 ccm NaCl-Lösung + 0,05 ccm Immunserum
- 8) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0	0	0
Kontrolle dazu	+++	+++	+++
von No. 2	0	0	0
Kontrolle dazu	+++	+++	++
von No. 3	+—0	0	0
Kontrolle dazu	+++	+++	+++—++
von No. 4	0	0	0
Kontrolle dazu	++	+±	+



	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 5	+—0	0	+—0
Kontrolle dazu	+++	+++	+++
von No. 6	+—0	0	0
Kontrolle dazu	+++	fast +++	fast +++
von No. 7	+++	+++	++
Kontrolle dazu	+++	+++	fast +++
von No. 8	+++	fast +++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	+—0		

IV. Versuch. 10 Kulturen Cholera werden mit 100 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und, in 10 Teile geteilt, gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,01 ccm Immunsrum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Pferdeserum + 0,01 ccm Immunsrum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Pferdeserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 5) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Kaninchenserum + 0,01 ccm Immunsrum
- 6) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Kaninchenserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 7) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Meerschweinchen serum + 0,01 ccm Immunsrum
- 8) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Meerschweinchen serum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 9) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immunsrum
- 10) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+—0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 5	+	0	0
Kontrolle	+±	+	+
von No. 6	++	+±	+
Kontrolle	0	0	0
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	fast +++	++
Kontrolle	0	0	0
von No. 9	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 10	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0		

V. Versuch. 8 Kulturen Cholera wurden mit 80 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 37° sensibilisiert und dann in 8 gleichen Teilen gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,01 ccm Immuns serum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Kaninchenserum + 0,01 ccm Immuns serum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Kaninchenserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 5) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rattenserum + 0,01 ccm Immuns serum
- 6) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rattenserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 7) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immuns serum
- 8) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	++	+	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+±	+	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 4	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	++	++
von No. 5	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 6	+++	+++	+++
Kontrolle	+	0	0
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	+++	+++
Meerschweinchenkomplement	+—0		

VI. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden mit 80 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und hierauf in 8 gleichen Teilen gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inaktives Rinderserum + 0,01 ccm Immuns serum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inaktives Rinderserum + 0,2 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inakt. Schweineserum + 0,01 ccm Immuns serum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inakt. Schweineserum + 0,2 ccm NaCl-Lösung
- 5) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inakt. Meerschweinchen-serum + 0,01 ccm Immuns serum
- 6) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm inakt. Meerschweinchen-serum + 0,2 ccm NaCl-Lösung

- 7) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immunserum
- 8) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+—0	+—0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	+—0	0	+—0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 4	+	+—0	+—0
Kontrolle	+++	+++—++	++
von No. 5	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 6	+++	+++	+++
Kontrolle	+ ± — +	+	+—0
von No. 7	+++	+++	+ + — + ±
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	+++	+ + + — + +
Meerschweinchenkomplement	0—+		

VII. Versuch. 11 Kulturen Cholera werden mit 110 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und hierauf in 12 gleichen Teilen gewaschen. Zur Extraktion der Bodensätze dient inaktives Rinderserum, Rattenserum, Meerschweinchen Serum, NaCl-Lösung und das Serum zweier Kaninchen, von denen das eine knapp 3 Wochen, das andere über 2 Jahre alt war.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inaktives Rinderserum + 0,005 ccm Immunserum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inaktives Rinderserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Kaninchenserum (alt) + 0,005 ccm Immunserum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Kaninchenserum (alt) + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 5) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Kaninchenserum (jung) + 0,005 ccm Immunserum
- 6) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Kaninchenserum (jung) + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 7) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inaktives Rattenserum + 0,005 ccm Immunserum
- 8) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inaktives Rattenserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 9) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Meerschweinchen-serum + 0,005 ccm Immunserum
- 10) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm inakt. Meerschweinchen-serum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 11) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,7 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum
- 12) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+—0	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 3	+±	+±	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 4	+±	+	+
Kontrolle	fast +++	++	++
von No. 5	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 6	fast +++	++	+±
Kontrolle	fast +++	+±	+
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+±	+	+
von No. 9	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 10	+++	fast +++	++
Kontrolle	+++—++	+	+
von No. 11	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 12	+ + +	+++	++
Meerschweinchenkomplement	0—+		

VIII. Versuch. 4 Kulturen Cholera wurden mit 40 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1h bei 42° sensibilisiert und in 4 gleichen Teilen gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm inakt. (56°) Hundeserum + 0,005 ccm Immunserum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm inakt. (56°) Hundeserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,8 ccm NaCl-Lösung.

Nach 1h Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+—0	+—0	+—+±
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 2	+	+	+
Kontrolle	+++	+++—++	+++—+±
von No. 3	+++	+++	++
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 4	fast +++	+++—++	+±
Meerschweinchenkomplement	+—0		

In den überaus zahlreichen Versuchen, in denen mit Rinderserum sensibilisierte Vibrionen der Einwirkung von Immunserum in Kochsalzverdünnung ausgesetzt waren, vermochten sie niemals die Immunkörper desselben aufzunehmen;

vielmehr erfolgte dabei aller Wahrscheinlichkeit nach sogar eine Abgabe der vorher aufgenommenen Rinderimmunkörper. Um so auffälliger war es in ebenso zahlreichen übereinstimmenden Versuchen die Ambozeptoren des Immunserums an die schon mit Rinderimmunkörper beladenen Vibrionen herantreten zu sehen, sobald das Immunserum statt in Kochsalzlösung in inaktivem Rinder Serum dargeboten wurde. Man kann also die Nichtabsorption der immunisatorisch erzeugten Choleraambozeptoren durch mit Rinder Serum sensibilisierte Vibrionen nicht einfach so erklären, daß man sagt, ihre Rezeptoren wären nach der Ausdrucksweise der Seitenkettentheorie bereits besetzt und zur Aufnahme neuer Immunkörper deshalb unfähig. Man kann auch nicht annehmen, daß am Cholera vibrio verschiedene Gruppen, Rezeptoren mit einer verschiedenen Avidität für die normalen und für die immunisatorisch erzeugten Immunkörper vorhanden seien, wie überhaupt die Frage nach der Avidität der Immunkörper zu der Cholerasubstanz in einer ganz eigentümlichen Beleuchtung erscheint. Es sieht ganz so aus, als ob durch die Behandlung mit normalem inaktivem Rinder Serum die Aviditätsverhältnisse ganz verschoben würden.

Die Verhältnisse werden noch komplizierter, sobald man das Verhalten der mit Rinder Serum sensibilisierten Vibrionen in anderen normalen, inaktiven Seren untersucht, welche dabei sofort in zwei Gruppen zerfallen. Das Serum von Pferden, Schweinen, Schafen und Hunden<sup>1)</sup> verhält sich wie das inaktive Rinder Serum selbst, d. h. die sensibilisierten Vibrionen geben darin während einstündiger Digestion bei 42° nicht nur nicht die aufgenommenen Rinderimmunkörper ab, sondern nehmen sogar noch die natürlichen Ambozeptoren auf. Mischt man Immunserum mit einem dieser fremden Sera, so werden auch die künstlichen Ambozeptoren ohne weiteres von den bereits mit Rinderimmunkörpern beladenen Vibrionen mehr weniger vollständig gebunden.

Ganz entgegengesetzt verhalten sich die Sera von Meer-schweinchen und Ratten, welche Resultate ganz analog denen

---

1) Es liegt bisher nur der eine angeführte Versuch (No. VIII) mit Hundeserum vor.

ergeben, die man bei der Behandlung von mit Rinder Serum sensibilisierten Vibrionen mit Kochsalzlösung gewinnt. In diesen Medien werden die vorher aufgenommenen normalen Immunkörper abgegeben und künstliche Ambozeptoren werden nicht mehr absorbiert. Diese Gesetzmäßigkeit war in allen Fällen zu erkennen, wenn auch die Details in geringem Grade schwankten.

Eine Art Mittelstellung nimmt das Kaninchenserum ein. In vielen Fällen zeigt es ein Verhalten, nach welchem es in die erste Gruppe der normalen Sera einzureihen wäre; in anderen wieder verhielt es sich wie ein Meerschweinchenserum. Der Versuch No. VII läßt es als möglich erscheinen, daß diese Verschiedenheit durch besondere Verhältnisse, namentlich das Alter der blutliefernden Tiere bedingt ist. Doch muß bemerkt werden, daß das Kaninchenserum auch sonst gelegentlich ganz sonderbare Resultate lieferte, so in Versuch IV, wo das Immunserum mit inaktivem Kaninchenserum zusammen auch ohne vorhergehende Behandlung mit sensibilisierten Vibrionen nur sehr schwach wirkte. Ob das ein reiner Zufall ist oder damit zusammenhängt, daß die beiden zu diesen Versuchen verwendeten Immunsere von Kaninchen stammten, welche mit bei 60° getöteten Vibrionen vorbehandelt waren, läßt sich nicht entscheiden.

Zur Erklärung des Verhaltens sensibilisierter Vibrionen gegen neu zugefügte Immunkörper wurden eine Anzahl von Versuchen angestellt. Zunächst wurde untersucht, ob die Stärke der Sensibilisierung, d. h. die Menge inaktiven Rinder Serums, mit der man Vibrionen vorbehandelt, von besonderem Einflusse ist. In der Regel wurde eine Agarkultur in 10 ccm inaktiven ( $\frac{1}{2}$  h 56°) Rinder Serums 1 h bei 42° belassen. Es sind oben bereits Versuche angeführt, wo die Sensibilisierung in zwei Etappen durchgeführt wurde, ohne daß dies am Resultate eine Aenderung ergab. Es stellte sich auch heraus, daß selbst eine 3mal nacheinander wiederholte Sensibilisierung mit großen Mengen inaktiven Rinder Serums noch immer eine weitere Absorption von Rinderimmunkörpern zuläßt. Das erfolgt selbst dann noch, wenn das zur zweiten und dritten Sensibilisierung verwendete Serum in seinem Immunkörpergehalte nur noch wenig vermindert erscheint.

IX. Versuch. Eine halbe Agarkultur wird 3mal nacheinander mit je 5 ccm inaktivem (56°) Rinderserum je  $\frac{1}{2}$  h bei 42° behandelt, dann gewaschen und mit 1 ccm NaCl-Lösung 1 h bei 42° digeriert. Untersucht werden die 3 Abgüsse und der Extrakt.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
Abguß I	++	+—0	0
Abguß II	fast +++	fast +++	++
Abguß III	+++	+++	fast +++
Extrakt	+++	+++	fast +++
Rinderserum 56°	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0—+		

X. Versuch. 4 Kulturen Cholera werden 3mal nacheinander je  $\frac{1}{2}$  h bei 42° mit je 5 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisiert, hierauf gewaschen und mit inaktivem Rinderserum, Kochsalzlösung, Immunsrum in Kochsalzlösung und einem aus sensibilisierten Vibrionen hergestellten Extrakte 1 h bei 42° behandelt. Der letztere war so gewonnen, daß 2 mit 20 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisierte Cholerakulturen mit 2 ccm NaCl-Lösung 1 h bei 42° extrahiert wurden.

- |                                      |                                 |   |
|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen | + 1 ccm inakt. (56°) Rinderser. | $\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1 \text{ h } 42^\circ \\ \text{zentrifug.} \end{array}$ |
| 2) " " " "                           | + 1 " Extrakt                   |   |
| 3) " " " "                           | + 0,95 ccm NaCl-Lösung +        |   |
| 4) " " " "                           | + 1 ccm NaCl-Lösung             |   |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm	0,0005 ccm
von No. 1	+	0	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++	++	++
von No. 2	+++	+++	+++	+++—++	++
Kontrolle	+++	+++	fast +++	+	+
von No. 3	+++	+++	+++	+++	++
Kontrolle	+++	+++	+++	+++	fast +++
von No. 4	+++	+++	fast +++	+++—+±	+
Meerschweinchenkomplement	0—+				

XI. Versuch. 4 Kulturen Cholera werden 3mal nacheinander mit je 40 ccm inaktivem Rinderserum je  $\frac{1}{2}$  h bei 42° sensibilisiert, hierauf in 4 Teilen gewaschen.

- 1) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,01 ccm Immunsrum
- 2) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 3) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 0,9 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immunsrum
- 4) mit Rinderserum sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung

Nach 1 h Digestion bei 42° abzentrifugiert.

Außerdem werden die Abgüsse nach der Vibrionensensibilisierung untersucht.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
Abguß I	+ ±	+	+
Abguß II	+++—++	++	+ ±
Abguß III	fast +++	++	++—+ ±
von No. 1	++	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+ ±	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++—++
von No. 3	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	+++	+++	++
Meerschweinchenkomplement	+		

In der stärkeren oder schwächeren Sensibilisierung kann also nicht der Grund des oben erwähnten Verhaltens gesucht werden. Die Versuche beweisen vielmehr, daß die mit Rinder- serum sensibilisierten Vibrionen noch immer mehr Rinder- immunkörper aufnehmen können, künstlich erzeugten Ambo- zeptor aber nur dann, wenn er ihnen gleichzeitig mit ersterem dargeboten wird.

Die dem Rinderserum analoge Wirkung des Pferde-, Schweine-, Schaf- und Hundeserums und die entgegengesetzte des Meerschweinchen- und Rattenserums könnte durch den verschiedenen Immunkörpergehalt der Sera bedingt sein. Denn im allgemeinen sind die Sera der ersten Gruppe von Natur aus immunkörperreich, die der zweiten daran wesentlich ärmer. Ganz stimmt das freilich nicht, und es ist auch nicht recht einzusehen, wieso der so viel höhere Gehalt eines Rinder- serums an natürlichen Ambozeptoren die Absorption dieser selbst und der noch hinzugefügten immunisatorisch erzeugten erklären könnte. Immerhin war es von Interesse, zu sehen, wie ein seiner Immunkörper beraubtes Rinderserum sich gegen- über sensibilisierten Vibrionen verhält. Dabei stehen zur Entfernung der Immunkörper zwei Mittel zur Verfügung: die spezifische Absorption durch Cholerasubstanz, welche vor- wiegend nur die gegen Cholera gerichteten, und die Erwärmung auf über 65°<sup>1)</sup>, welche alle Immunkörper beseitigt.

XII. Versuch. 4 Kulturen Cholera wurden mit 40 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und hierauf, in 4 gleiche Teile geteilt, gewaschen.

1) Vergl. Bail und Tsuda, diese Zeitschrift, Bd. 1, No. 4.



- 1) Sensib. Vibr. + (0,75 ccm Rinderser. + 0,25 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$  h 56°  
 2) " " + (0,75 " " + 0,25 " " " " )  $\frac{1}{2}$  h 66°  
 3) " " + (0,75 " " + 0,25 " " " " )  $\frac{1}{2}$  h 56°  
 und mit Vibrionen erschöpft  
 4) " " + 1 ccm NaCl-Lösung

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm
von No. 1	++	+±	+—0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+++—++	++	+—+±
Kontrolle	+	+	+—0
von No. 3	+—0	+—0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 4	+++	+++	+++
Meerschweinchenkomplement	+—+±		

XIII. Versuch. Genau wie der vorige angesetzt.

	0,1 cmm	0,05 ccm	0,01 ccm
von No. 1	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	++	++	+±
Kontrolle	+—0	0	0
von No. 3	0	0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 4	+++	+++	+++
Meerschweinchenkomplement	+—0		

XIV. Versuch. 5 Kulturen Cholera werden 2mal nacheinander, zuerst mit je 7, dann mit je 5 ccm inaktivem Rinderserum pro Kultur sensibilisiert und, in 5 Teile geteilt, gewaschen.

- 1) Sensib. Vibr. + (0,75 ccm Rinderser. + 0,25 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$  h 56°  
 2) " " + (0,75 " " + 0,25 " " " " )  $\frac{1}{2}$  h 66°  
 3) " " + (0,75 " " + 0,25 " " " " )  $\frac{1}{2}$  h 56°  
 dann mit Vibrionen erschöpft  
 4) " " + 0,95 " NaCl-Lösung + 0,0005 ccm Immunsrum  
 5) " " + 1 " " "

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm	0,0005 ccm
von No. 1	+	+—0	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++	++	+±
von No. 2	++	++	+ +—+±	+±	+—0
Kontrolle	+—0	0	0	0	0
von No. 3	0	0	0	0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0
von No. 4	+++	+++	+++	++	+
Kontrolle	+++	++	+±	+—0	+—0
von No. 5	+++	+++	fast +++	++	+
Meerschweinchenkomplement	+—0				

XV. Versuch. 7 Kulturen Cholera wurden mit 70 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1 h bei 42° sensibilisiert und, in 8 Teile geteilt, gewaschen.

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   | } 1h 42°; zentrifugiert |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,1 ccm NaCl                                     |                         |
| 2) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,001 ccm Immunserum                             |                         |
| 3) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,1 ccm NaCl-Lösung                              |                         |
| 4) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,001 ccm Immunserum                             |                         |
| 5) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,1 ccm NaCl-Lösung  |                         |
| 6) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,001 ccm Immunserum |                         |
| 7) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,001 ccm Immunserum        |                         |
| 8) Sensib. Vibrionen + 1,1 ccm NaCl-Lösung                             |                         |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+ ± — +	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+ — 0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	0	0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 4	0 — +	0 — +	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 5	0	0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 6	0 — +	0	0
Kontrolle	0 — +	0	0
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0 — +		

XVI. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden mit 80 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert und, in 8 Teile geteilt, gewaschen.

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   | } 1h 42°; zentrifugiert |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,005 ccm Immunserum                             |                         |
| 2) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,05 ccm NaCl-Lösung                             |                         |
| 3) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,005 ccm Immunserum                             |                         |
| 4) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,05 ccm NaCl-Lösung                             |                         |
| 5) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,005 ccm Immunserum |                         |
| 6) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung)   |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,05 ccm NaCl-Lösung |                         |
| 7) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum        |                         |
| 8) Sensib. Vibrionen + 1,05 ccm NaCl-Lösung                            |                         |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0 — +	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	0 — +	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 3	+ ±	+	0
Kontrolle	+++	+++	++

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 4	+ ± — +	+	0
Kontrolle	0 — +	0	0
von No. 5	+	+	0
Kontrolle	+ ±	+	0
von No. 6	+	0 — +	0
Kontrolle	0 — +	0	0
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 8	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0		

XVII. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden mit 80 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1h bei 42° sensibilisiert und, in 8 Teile geteilt, gewaschen.

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) | } 1h 42°; zentrifugiert |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,005 ccm Immuneserum                          |                         |
| 2) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 56° + 0,05 ccm NaCl-Lösung                           |                         |
| 3) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,005 ccm Immuneserum                          |                         |
| 4) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) |                         |
| $\frac{1}{2}$ h 66° + 0,05 ccm NaCl-Lösung                           |                         |
| 5) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) |                         |
| 1h 66° + 0,005 ccm Immuneserum                                       |                         |
| 6) Sensib. Vibrionen + (0,75 ccm Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung) |                         |
| 1h 66° + 0,05 ccm NaCl-Lösung  |                         |
| 7) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immuneserum     |                         |
| 8) Sensib. Vibrionen + 1,05 ccm NaCl-Lösung                          |                         |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	++	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+ ±	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	+	+	+
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	++	+	+
Kontrolle	0	0	0
von No. 5	++	+	+
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 6	++	+ ±	+
Kontrolle	0	0	0
von No. 7	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++ — ++	++
von No. 8	+++	fast +++	+++ — ++
Meerschweinchenkomplement	0 — +		

In bezug auf die durch Behandlung mit Vibrionen erschöpften Rindersera verliefen alle Versuche übereinstimmend, wobei bemerkt sei, daß zur Erschöpfung 1—2 Kulturen lebender Vibrionen auf 4 ccm des meist im Verhältnisse 3:1 verdünnten Rinderserums kamen. Durch diese Behandlung,

welche einen vollständigen Verlust der bakteriolytischen Serumwirkung herbeiführt, wird an der Unfähigkeit des Rinderserums, den an Vibrionen gebundenen Rinderimmunkörper abzuspalten, nichts geändert. Ganz in Uebereinstimmung damit vermag ein derartiges Serum auch den künstlichen Ambozeptor eines Immunserums an die bereits sensibilisierten Vibrionen zu ketten, so daß es sich von einem gewöhnlichen inaktiven Rinderserum in dieser Hinsicht gar nicht unterscheidet. Nur nebenbei sei darauf hingewiesen, daß die erschöpften Sera schon an sich Immunserum unwirksam machen konnten. Sie verhielten sich also ähnlich wie Choleraextrakte mit Wasser oder Kochsalzlösung. Diese sonst in diesem Grade nicht regelmäßige Wirkung beruht jedenfalls darauf, daß die Erschöpfung mit einem verdünnten Serum und mit übermäßig großen Kulturmengen vorgenommen wurde. Daß dieser Umstand von keiner großen Bedeutung ist, beweisen Versuche, in denen die an sich hemmende Wirkung des erschöpften Serums viel weniger hervortritt.

XVIII. Versuch. 7 Kulturen Cholera werden mit 70 ccm inaktivem (56°) Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und, in 8 Teile geteilt, gewaschen.

- 1) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> 56° + 0,01 ccm Immunserum
- 2) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{3}$ <sup>h</sup> 56° + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 3) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{3}$ <sup>h</sup> 66° + 0,01 ccm Immunserum
- 4) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> 66° + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 5) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{3}$ <sup>h</sup> 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,01 ccm Immunserum
- 6) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Rinderser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$ <sup>h</sup> 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 7) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immunserum
- 8) Sensib. Vibrionen + 1,1 ccm NaCl-Lösung

Nach 1<sup>h</sup> Digestion bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+ ±	+—0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+	+—0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 3	+ + — + ±	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 4	+ + - + ±	+	+
Kontrolle	0	0	0
von No. 5	0	0	0
Kontrolle	+ + +	+ ±	+
von No. 6	0	0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 7	+ + +	+ + +	+ + +
Kontrolle	+ + +	+ + +	+ + +
von No. 8	+ + +	+ + +	fast + + +
Meerschweinchenkomplement	0		

Weniger eindeutig verliefen die Versuche mit Rinder-serum, dessen Immunkörper durch die hohe Temperatur von 66° unwirksam gemacht waren. Es kam vereinzelt vor, daß solches Serum durch Behandlung mit vorher sensibilisierten Vibrionen wieder recht stark wirksam wurde, also zu einer nicht unbeträchtlichen Abspaltung der bereits gebundenen Rinderimmunkörper Veranlassung gegeben hatte (Versuch XII, XIII, XIV), meist war aber die Abspaltung viel geringer und fehlte auch wohl ganz. Dementsprechend verhielt sich auch das damit gemischte Immunserum, das von den bereits mit Rinder Serum sensibilisierten Vibrionen gebunden wurde, wenn-gleich nicht so stark, wie bei Anwendung des in gewöhnlicher Weise inaktivierten Rinder-serums. Ein Versuch (No. XVII), durch länger dauernde Erhitzung auf 66° die abspaltende Wirkung des Serums zu erhöhen, hatte nur einen zweifel-haften Erfolg, so daß bis auf weiteres die Frage nach der Bedeutung der Immunkörper für die beschriebene Eigen-tümlichkeit ungelöst bleibt.

Es sei bemerkt, daß sich Vibrionen, welche mit Pferde-serum sensibilisiert sind, genau so wie mit Rinder Serum be-handelte verhalten.

XIX. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden mit 80 ccm inaktivem (56°) Pferdeserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und in 8 Teilen gewaschen.

- 1) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung) 1/2<sup>h</sup> 56° + 0,01 ccm Immunserum
- 2) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung) 1/2<sup>h</sup> 56° + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 3) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung) 1/2<sup>h</sup> 66° + 0,01 ccm Immunserum
- 4) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung) 1/2<sup>h</sup> 66° + 0,1 ccm NaCl-Lösung
- 5) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung) 1/2<sup>h</sup> 56° und mit Vibrionen erschöpft + 0,01 ccm Immunserum

- 6) Sensib. Vibrionen + (0,8 ccm Pferdeser. + 0,2 ccm NaCl-Lösung)  $\frac{1}{2}$ h 56°  
und mit Vibrionen erschöpft + 0,1 ccm NaCl-Lösung  
7) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,01 ccm Immunserum  
8) Sensib. Vibrionen + 1,1 ccm NaCl-Lösung

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+ ±	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 3	+ ±	+ ±	+
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 4	+ ±	+ ± — +	+
Kontrolle	0	0	0
von No. 5	0	0	0
Kontrolle	+ ±	+ ±	+
von No. 6	0	0	0
Kontrolle	0	0	0
von No. 7	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++	+++ — + +
von No. 8	+++	fast +++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0		

Es mußte weiter von Interesse sein, zu untersuchen, wie sich die von sensibilisierten Vibrionen abgesprengten Rinderimmunkörper unter diesen Bedingungen verhalten.

XX. Versuch. Durch Sensibilisierung von 2 Kulturen Cholera mit 20 ccm inaktivem Rinderserum und nachherige 1<sup>h</sup> Digestion der gewaschenen Kulturmasse bei 42° in 2 ccm NaCl-Lösung wird ein „Extrakt“ hergestellt. Hierauf werden 3 Agarkulturen mit 30 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisiert und, in 4 Teile geteilt, gewaschen.

- 1) Sensib. Vibrionen + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung  
2) „ „ + 1 ccm Extrakt  
3) „ „ + 0,95 ccm NaCl-Lösung + 0,0005 ccm Immunser.  
4) „ „ + 1 ccm NaCl-Lösung
- } 1<sup>h</sup> 42°;  
zentrifug.

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm
von No. 1	0—+	0—+	0—+	0—+	0—+
Kontrolle	+++	+++	fast +++	+++ — + +	++
von No. 2	+++	+++	+++	fast +++	++
Kontrolle	+++	+++	fast +++	fast +++	+
von No. 3	+++	+++	+++	fast +++	+++ — + +
Kontrolle	+++ — + +	+ ±	+	+ — 0	+ — 0
von No. 4	+++	+++	fast +++	++	+
Meerschweinchenkomplement	0—+				

XXI. Versuch. Extrakt durch 1<sup>h</sup> Digestion von 2 mit 20 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisierten Vibrionen in 2 ccm NaCl-Lösung bei 42° gewonnen. Zur Sensibilisierung der Vibrionen kommen 10 ccm inaktives Rinderserum auf eine Kultur.

1) 1 Kultur sensib. Vibrionen + 1 ccm Extrakt				
2) 1 " " " + 0,75 ccm inaktives Rinderserum +				1h 42°; zentrifugiert
0,25 ccm NaCl-Lösung				
3) 1 " " " + 1 cm NaCl-Lösung				
	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,001 ccm
von No. 1	+++	+++	+++	++-+++
Kontrolle	+++	+++	+++	++-+++
von No. 2	0	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++	++
von No. 3	+++	+++	+++	+
Meerschweinchenkomplement	0			

XXII. Versuch. Extrakt durch einstündige Digestion von 3 mit 30 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisierten Vibrionen in 2,5 ccm NaCl-Lösung bei 42° gewonnen. 9 Kulturen Cholera werden mit 90 ccm inaktivem (56°) Rinderserum sensibilisiert, und in 9 gleiche Teile geteilt, gewaschen.

1) Sensib. Vibr. + 0,6 ccm inakt. (56°) Rinderser. + 0,35 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunser.					1h 42°; zentrifugiert
2) " " + 0,6 " " " " + 0,4 " Extrakt					
3) " " + 0,6 " " " " + 0,4 " NaCl-Lösung					
4) " " + 0,6 " " " Meersch.-Ser. + 0,35 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunser.					
5) " " + 0,6 " " " Meersch.-Ser. + 0,4 ccm Extrakt					
6) " " + 0,6 " " " " + 0,4 " NaCl-Lösung					
7) " " + 0,95 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum					
8) " " + 0,6 " " " + 0,4 " Extrakt					
9) " " + 1 " " " "					

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0	0	0;
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	0	0	0—+
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 5	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 6	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+	0	0
von No. 7	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 8	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 9	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0—+		

XXIII. Versuch. Extrakt durch einstündige Digestion von 2 mit 20 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisierten Cholerakulturen mit 1,5 ccm NaCl-Lösung bei 42° gewonnen. 9 Kulturen Cholera mit 90 ccm inaktivem Rinderserum sensibilisiert.

1)	Sensib. Vibr.	+ 0,6 ccm inakt. (56°)	Rinderser.	+ 0,35 ccm NaCl-Lösung	+ 0,005 ccm Immuner.	} 1 h, 42°, zentrifugiert
2)	"	"	"	"	+ 0,4 ccm Extrakt	
3)	"	"	"	"	+ 0,4 " NaCl-Lösung	
4)	"	"	"	Kaninchenser.	+ 0,35 " NaCl-Lösung	
					+ 0,005 ccm Immuner.	
5)	"	"	"	"	+ 0,4 ccm Extrakt	
6)	"	"	"	"	+ 0,4 " NaCl-Lösung	
7)	"	"	"	NaCl-Lösung	+ 0,005 ccm Immuneserum	
8)	"	"	"	"	+ 0,4 ccm Extrakt	
9)	"	"	"	"	"	

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+ ±	+	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	+ ±	+	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	++	+ ±	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 5	+ + - + + +	+ ±	+
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 6	+ ±	+	+
Kontrolle	++	++	+ ±
von No. 7	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 8	+++	+++	++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 9	+++	+++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	+—0		

Der durch Digestion in Kochsalzlösung bei 42° von sensibilisierten Vibrionen abgesprengte Rinderimmunkörper verhält sich also genau so wie ein immunisatorisch erzeugter Ambozeptor: er wird von mit Rinderserum bereits sensibilisierten Vibrionen in Kochsalzlösung und Meerschweinchen-serum nicht gebunden, wohl aber in Rinderserum; im Kaninchenserum ist das Resultat gerade so wie beim Immunambozeptor unsicher.

Dannach könnte man versucht sein anzunehmen, daß der einmal abgesprengte Rinderimmunkörper andere Eigenschaften angenommen hat, als er ursprünglich hatte, daß er einem Immunambozeptor ähnlich geworden sei, was ein Ergebnis von höchster Tragweite wäre und das nicht unmöglich erscheint. Vorläufig läßt es sich aber nicht mit Sicherheit annehmen, da man nicht anzugeben imstande ist, ob nicht der normale Rinderimmunkörper, wenn wir ihn auf andere Weise als durch Digestion sensibilisierter Vibrionen gewinnen könnten, in Koch-



salzlösung oder Meerschweinchenserum sich ebenso wie der Immunambozeptor verhalten würde. Das einzige Mittel, welches zur Entscheidung angewendet werden kann, besteht in der Untersuchung verdünnter Rindersera, aber es ist, wie nicht erst näher begündet zu werden braucht, nicht sehr sicher.

Schon früher<sup>1)</sup> war festgestellt worden, daß ein Zusatz von inaktivem Rinderserum zu Kochsalzlösung die Abspaltung der bakteriolytischen Immunkörper von den sensibilisierten Vibrionen verhindert. Das wurde nunmehr genau untersucht.

XXIV. Versuch. 8 Kulturen Cholera wurden mit 80 ccm inaktivem Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und, in 8 gleiche Teile geteilt, gewaschen.

1) Sensib. Vibr. + 0,95 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum					
2) " " + 1 " " "					
3) " " + 0,85 " " "	+ 0,1	"	inakt. Rinderser.		
	+ 0,005	"	Immunserum		
4) " " + 0,9 " " "	+ 0,1	"	inakt. Rinderser.		
5) " " + 0,75 " " "	+ 0,2	"	"		
	+ 0,005	"	Immunserum		
6) " " + 0,8 " " "	+ 0,2	"	inakt. Rinderser.		
7) " " + 0,65 " " "	+ 0,3	"	"		
	+ 0,005	"	Immunserum		
8) " " + 0,7 " " "	+ 0,3	"	inakt. Rinderser.		

1<sup>h</sup> 42°; zentrifugiert

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+++	+++	+++—++
Kontrolle	+++	+++	+++—++
von No. 2	+++	+++	+++—++
von No. 3	++	++	+
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 4	++—+±	+±	0
Kontrolle	+++—++	+±	+
von No. 5	0—+	0	0
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 6	0	0	0
Kontrolle	+++—++	++	+
von No. 7	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++—++
von No. 8	0	0	0
Kontrolle	+++	+±—++	+
Meerschweinchenkomplement	+—0		

XXV. Versuch. 6 Kulturen Cholera werden mit 60 ccm inaktivem Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert und hierauf, in 6 gleiche Teile geteilt, gewaschen.

1) Vergl. diese Zeitschrift, Bd. 1, No. 4, p. 590.

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1) Sensib. Vibrionen + 1 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum  | } 1h 42°; zentrifugiert |
| 2) Sensib. Vibrionen + 0,95 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum<br>+ 0,05 ccm inaktives Rinderserum |                         |
| 3) Sensib. Vibrionen + 0,9 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum<br>+ 0,1 ccm inaktives Rinderserum   |                         |
| 4) Sensib. Vibrionen + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum<br>+ 0,25 ccm inaktives Rinderserum |                         |
| 5) Sensib. Vibrionen + 0,25 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum<br>+ 0,75 ccm inaktives Rinderserum |                         |
| 6) Sensib. Vibrionen + 1,05 ccm NaCl-Lösung.   |                         |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+++	+++	fast +++
Kontrolle	+++	+++—++	++
von No. 2	+++	fast +++	++
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 3	+++	+++—++	+±
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 4	++	+±	+
Kontrolle	+++	fast +++	+++—++
von No. 5	++	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 6	+++	fast +++	+++—++
Meerscheinkomplement	+—0.		

Aus den Versuchen geht hervor, daß schon der Zusatz relativ geringer Mengen inaktiven Rinderserums zu Kochsalzlösung genügt, um einerseits die Abspaltung der an Vibrionen gebundenen Rinderimmunkörper zu verhindern, um andererseits die Bindung neuer, normaler und künstlicher Ambozeptoren an bereits sensibilisierte Vibrionen zu erleichtern. Es wird dadurch, wenn auch noch nicht streng bewiesen, so doch wahrscheinlich, daß auch normale Immunkörper an sich, d. h. in Kochsalzlösung verteilt, nur eine geringe Neigung zeigen, an Cholerasubstanz heranzutreten, daß diese aber durch eine besondere Eigenschaft des inaktiven Serums außerordentlich verstärkt wird.

Sensibilisiert man Vibrionen mit Immunserum in Kochsalzlösung und stellt mit ihnen analoge Versuche wie die mitgeteilten an, so kann man je nach der Stärke der Sensibilisation ganz verschiedene Resultate erhalten, worüber zwei Versuchsprotokolle folgen mögen.

XXVI. Versuch. 2 Kulturen Cholera werden in 20 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und  $\frac{1}{4}$ h mit Zusatz von 0,25 ccm Immunserum bei 42° sensibilisiert. Der abzentrifugierte Satz wird hierauf nochmals mit 20 ccm NaCl-Lösung und 0,3 ccm Immunserum  $\frac{1}{4}$ h bei 42° behandelt, worauf der in 4 Teile geteilte Bakteriensatz sorgfältig gewaschen wird.

- |  |   |
|--|---|
| 1) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,0025 ccm Immunserum | $\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1\text{h } 42^{\circ}; \\ \text{zentrifugiert} \end{array}$ |
| 2) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung  |   |
| 3) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,0025 ccm Immunserum              |   |
| 4) Sensib. Vibr. + 1 ccm NaCl-Lösung   |   |

	0,1 ccm	0,05 ccm	0,005 ccm
von No. 1	fast + + +	+ ± — +	+
Kontrolle	+ + +	+ + +	+ + +
von No. 2	+	+ ±	+ — 0
Kontrolle	+ + +	+ + +	+ + +
von No. 3	+ + +	+ + +	+ + +
Kontrolle	+ + +	+ + +	+ + +
von No. 4	+ + +	+ + +	fast + + +
Meerschweinchenkomplement	+		

XXVII. Versuch. 4 Kulturen Cholera werden in 40 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,4 ccm Immunserum 1h bei 42° sensibilisiert, hierauf in 4 Teilen sorgfältig gewaschen.

- |  |   |
|--|---|
| 1) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,0025 ccm Immunserum | $\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1\text{h } 42^{\circ}; \\ \text{zentrifugiert} \end{array}$ |
| 2) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung  |   |
| 3) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,0025 ccm Immunserum              |   |
| 4) Sensib. Vibr. + 1 ccm NaCl-Lösung   |   |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0	0	0
Kontrolle	+ + +	+ + +	fast + + +
von No. 2	0	0	0
Kontrolle	+ + +	+ + +	fast + + +
von No. 3	+ — 0	0	0
Kontrolle	+ + +	fast + + +	+ +
von No. 4	+ — 0	0	0
Meerschweinchenkomplement	0		

Man erkennt bei einem Vergleiche sofort, daß die relativ schwach sensibilisierten Vibrionen des XXVII. Versuches (0,1 ccm Immunserum für die Kultur) noch gierig andere Immunkörper aufnehmen, dafür aber in Kochsalzlösung schwer abgeben, während die übermäßig besetzten Vibrionen des XXVI. Versuches sich gerade umgekehrt verhalten. Ueberhaupt wird man bei Reagenzglasversuchen mit Immunserum leicht bemerken, daß sich die künstlichen Ambozeptoren nur dann leicht von Vibrionen in Kochsalzlösung abspalten lassen, wenn sie von vornherein reichlich zugesetzt wurden; bei normalen Immunkörpern tritt das nicht so hervor.

Immerhin merkt man schon aus den beiden angeführten Versuchen, daß auch mit Immunserum sensibilisierte Vibri-

onen neue immunisatorisch erzeugte Ambozeptoren aus Kochsalzlösung nur schwer, sehr leicht aber aus Rinderserum gleichzeitig mit dessen normalen Immunkörpern aufnehmen. Das ließ sich auch weiterhin bestätigen.

XXVIII. Versuch. Je 4 Kulturen Cholera werden in je 20 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Zu der einen Partie wird 0,1 ccm, zur anderen 1 ccm hochwertigen Immunserums zugesetzt. Während 1<sup>h</sup> Aufenthaltes bei 42° erfolgt entsprechend langsame und schnelle Agglutination. Die in je 4 gleiche Teile geteilten Bakteriensätze werden sorgfältig gewaschen.

- |   |  |
|---|--|
| 1) Schwach sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. Rinderserum + 0,005 ccm Immunserum | } 1 <sup>h</sup> 42°;<br>zentrifugiert |
| 2) Schwach sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung |  |
| 3) Schwach sensib. Vibr. + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum        |  |
| 4) Schwach sensib. Vibr. + 1 ccm NaCl-Lösung                                  |  |
| 5—8) in gleicher Weise mit den stark sensibilisierten Vibrionen               |  |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	0	0—+	0
„ No. 2	0	0	0
„ No. 3	++	+±	+
„ No. 4	fast +++	+±	+
„ No. 5	+±	+	+
„ No. 6	++	0	0
„ No. 7	+++	++	++
„ No. 8	+++	++	++
Kontrolle zu 1 und 5	+++	+++	+++
„ „ 2 und 6	+++	fast +++	+++—++
„ „ 3 und 7	+++	fast +++	fast +++
Meerschweinchenkomplement	0—+		

Der Unterschied zwischen stark und schwach sensibilisierten Vibrionen tritt hier nicht so auffallend hervor wie in den vorigen beiden Versuchen, ist aber deutlich; ebenso läßt sich leicht erkennen, wie die bereits mit künstlichem Ambozeptor beladenen Vibrionen aus Kochsalzlösung viel schwerer als aus Rinderserum neue Ambozeptoren aufnehmen. Es mußte nun noch untersucht werden, wie sich die mit Immunserum sensibilisierten Vibrionen gegen andere Sera verhalten, namentlich ob auch unter diesen Bedingungen sich Meerschweinchenserum anders als Rinderserum verhält.

XXIX. Versuch. 5 Kulturen Cholera wurden in 30 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,5 ccm Immunserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert. Der abzentrifugierte Bakteriensatz wurde in 6 Teile geteilt und sorgfältig gewaschen.

- |   |   |
|---|---|
| 1) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Pferdeserum + 0,005 ccm Immunserum | $\left. \begin{array}{l} 1^h \text{ } 42^\circ; \\ \text{zentrifugiert} \end{array} \right\}$ |
| 2) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Pferdeserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung |   |
| 3) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Schafserum + 0,005 ccm Immunserum  |   |
| 4) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Schafserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung  |   |
| 5) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum              |   |
| 6) Sensib. Vibr. + 1 ccm NaCl-Lösung  |   |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+—0	+	+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 2	0	0	0—+
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 3	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	+++
von No. 4	0	0	0
Kontrolle	+++	+++	++
von No. 5	fast +++	+++—++	++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 6	+++	fast +++	++
Meerschweinchenkomplement	0		

XXX. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden in 32 ccm NaCl-Lösung verteilt und nach Zusatz von 1,6 ccm Immunserum 1<sup>h</sup> bei 42° unter schneller und vollständiger Agglutination gehalten. Hierauf wird die Bakterienmasse in 8 gleiche Teile geteilt und sorgfältig gewaschen.

- 1) Sensib. Vibr. + 0,75 ccm inakt. (56°) Rinderserum + 0,005 ccm Immunser.
- 2) " " + 0,75 " " (56°) " + 0,25 ccm NaCl-Lösung
- 3) " " + 0,75 " " (56°) Meersch.-Ser. + 0,005 ccm Immunser.
- 4) " " + 0,75 " " (56°) " + 0,25 ccm NaCl-Lösg.
- 5) " " + 0,75 " " (56°) Rattenserum + 0,005 ccm Immunser.
- 6) " " + 0,75 " " (56°) " + 0,25 ccm NaCl-Lösung
- 7) " " + 0,75 " NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum
- 8) " " + 1 ccm NaCl-Lösung

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+	0	0
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 2	0	0	0
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 3	+++	+++	+++
Kontrolle	+++	+++	fast +++
von No. 4	+++	fast +++	++
Kontrolle	++	++	+
von No. 5	+++	+++—++	++
Kontrolle	+++	fast +++	fast +++
von No. 6	+++	++	++
Kontrolle	0	0	0
von No. 7	+++	fast +++	++
Kontrolle	+++	fast +++	++
von No. 8	+++	fast +++	++
Meerschweinchenkomplement	0		

Es besteht somit im ganzen eine gute Uebereinstimmung in dem Verhalten der mit Normalserum und mit Immunserum vorbehandelten Vibrionen, so daß sich als Gesetz von allgemeinerer Bedeutung aufstellen läßt: Cholera-vibrionen, welche einen bakteriolytischen Immunkörper in genügender Menge aufgenommen haben, nehmen aus Kochsalzlösung, Meer-schweinchen- und Rattenserum keine neuen Immunkörper mehr auf, sondern geben die vorher gebundenen leicht (einstündiges Digerieren bei 42°) wieder ab. Die in gleicher Weise sensibilisierten Vibrionen halten die aufgenommenen Immunkörper in Rinder-, Pferde-, Schaf- und Schweineserum unter den gleichen Bedingungen nicht nur hartnäckig fest, sondern nehmen aus diesen Seren noch andere Immunkörper mit Leichtigkeit auf.

Diese Feststellungen haben zunächst Bedeutung für das Studium der Aviditätsverhältnisse zwischen einem Antigen und dem zugehörigen Antikörper. Man mißt die Avidität nach der Menge und Intensität, mit welcher die Antikörper aufgenommen werden. Es zeigt sich aber, daß dafür noch ein anderer Umstand maßgebend ist, das Medium, in welchem man die Antikörper darbietet. Denn Vibrionen, deren Avidität z. B. durch Rinderimmunkörper anscheinend auch für künstliche Choleraambozeptoren ganz abgesättigt ist, erweisen sich für die gleichen Ambozeptoren sofort wieder aufnahmefähig, sobald man etwas inaktives Rinderserum mitgibt. Man wird mit dieser Tatsache in Zukunft rechnen und dieser neuen Eigenschaft der Sera einige Aufmerksamkeit schenken müssen.

Dabei ist es höchst auffällig, daß die Aviditätssteigerung nicht dem Serum aller, sondern nur einiger Tiere zukommt, und es ist leider bisher nicht gelungen, zu erklären, warum das Serum des Meerschweinchens oder der Ratte sich so ganz anders verhält als das des Pferdes oder des Rindes.

Man kann nun fragen, ob diese Feststellungen auch für das Verhalten der Cholera-vibrionen im Tierkörper eine Bedeutung haben. Es ist klar, daß die Reagenzglasversuche, ausgeführt mit inaktivem Serum, im Tierkörper zunächst kein Analogon finden. Mindestens mußte untersucht werden, wie sich aktive Flüssigkeiten verhalten, und da ergaben sich sofort bedeutende Unterschiede.

**XXXI. Versuch.** 2 Kulturen Cholera wurden mit 20 ccm inaktivem Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° sensibilisiert, hierauf in 3 Teile geteilt und gewaschen.

- |   |  |
|---|--|
| 1) Sensib. Vibrionen + 1 ccm aktives Rinderserum            | } 1 <sup>h</sup> 42°;<br>zentrifugiert |
| 2) " " + 1 ccm inaktives ( $\frac{1}{2}$ h 56°) Rinderserum |  |
| 3) " " + 1 ccm NaCl-Lösung                                  |  |

Die Probe 1 wurde vor der Verwendung  $\frac{1}{2}$  h auf 56° erwärmt.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	++	+	0
" No. 2	0	0	0
" No. 3	+++	+++	+++
" inakt. Rinderserum	+++	+++	++
Meerschweinchenkomplement	0		

Wie bereits früher mitgeteilte Versuche<sup>1)</sup>, beweist auch dieser, daß mit inaktivem Rinderserum sensibilisierte Vibrionen aus aktivem Rinderserum weit weniger bakteriolytische Immunkörper absorbieren, als aus dem gleichen, aber vorher erhitzten Serum. Das kann so weit gehen, daß überhaupt keine Absorption mehr nachweisbar ist.

Aufschlüsse darüber erhält man beim Studium der Wirkung, welche der Rückstand aus Vibrionen, welche mit aktivem Serum behandelt sind, auf ein Serum ausübt. Ueber das Aussehen dieses Rückstandes ist ebenfalls bereits früher berichtet worden<sup>2)</sup>.

**XXXII. Versuch.** 2 Kulturen Cholera werden mit 20 ccm aktivem Rinderserum unter vollständiger Granulabildung 1<sup>h</sup> bei 42° behandelt, der Rückstand in 3 Teile geteilt und gewaschen.

- |   |   |
|---|---|
| 1) Rückstand + 1 ccm aktives Rinderserum            | } 1 <sup>h</sup> 42°; zentrifugiert, die<br>Probe 1 vor der Verwen-<br>dung $\frac{1}{2}$ h auf 56° erwärmt |
| 2) " + 1 " inakt. ( $\frac{1}{2}$ h 56°) Rinderser. |   |
| 3) " + 1 " NaCl-Lösung                              |   |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+++	+++	+++
" No. 2	+++	+++	+++
" No. 3	+++	+++	+++
" inakt. Rinderserum	+++	+++	++
Meerschweinchenkomplement	0		

**XXXIII. Versuch.** 3 Kulturen Cholera werden mit 24 ccm aktivem Rinderserum 1<sup>h</sup> bei 42° behandelt. Der Rückstand wird in 3 Teile geteilt und gewaschen.

1) Diese Zeitschrift, Bd. 1, No. 4, p. 583 ff.

2) a. a. O. p. 591 ff.

1) Rückstand + 0,75 ccm aktives Rinderser. + 0,25 ccm NaCl-Lösung	1h 42°; zentrifug. Die Probe 1 wird dann 1/2h auf 56° erwärmt
2) „ + 0,75 „ inakt. „ + 0,25 ccm NaCl-Lösung	
3) „ + 1 „ NaCl-Lösung	
	0,05 ccm      0,005 ccm      0,001 ccm      0,0005 ccm
von No. 1	+++      + + + — + +      + — 0      0
„ No. 2	+++      fast + + +      + — 0      0
„ No. 3	+++      + +      0      0
„ inakt. Rinderser. 3:1	+++      fast + + +      + + — + ±      0
Meerschweinchenkomplement	0

XXXIV. Versuch. 3 Kulturen Cholera werden 2mal nacheinander mit je 15 ccm aktivem Rinderserum je 1/2h bei 42° behandelt und der Rückstand in 4 Teilen gewaschen. Zum Vergleich werden 3 ebenso üppige Kulturen in analoger Weise der Wirkung des gleichen, aber vorher 1/2h auf 56° erhitzten Rinderserums ausgesetzt.

- 1) Rückstand + 0,8 ccm inaktives Rinderserum + 0,002 ccm Immunsrum
- 2) „ + 0,8 „ + 0,2 „ NaCl-Lösung
- 3) „ + 0,8 „ NaCl-Lösung + 0,002 ccm Immunsrum
- 4) „ + 1 „ NaCl-Lösung
- 5—8 ganz ebenso mit Vibrionen, welche mit inaktivem Rinderserum sensibilisiert waren

Nach 1h Aufenthalt bei 42° abzentrifugiert.

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+++	fast +++	fast +++
„ No. 2	+++	fast +++	fast +++
„ No. 3	+++	+++—++	+±
„ No. 4	fast +++	fast +++	++
„ No. 5	0	0	0
„ No. 6	+	0	0
„ No. 7	+++	+++	fast +++
„ No. 8	+++	+++	fast +++
Kontrolle zu 1 und 5	+++	+++	fast +++
„ „ 2 und 6	+++	fast +++	+++—++
„ „ 3 und 7	fast +++	+++—++	+±
Meerschweinchenkomplement	0		

Es verhält sich somit der Rückstand nach Behandlung von Vibrionen mit aktivem Serum ganz anders als der, welchen man nach der Behandlung mit dem gleichen, aber inaktivierten Serum erhält. Sie sind sich nur insofern gleich, als beide in Kochsalzlösung Immunkörper abgeben<sup>1)</sup> und aus ihr kein Immunsrum mehr binden. Aber der Granularrückstand bindet auch aus inaktivem Rinderserum und aus Mischungen von diesem

1) Die quantitativen Verhältnisse bei der Abgabe der Immunkörper von Rückständen mit aktivem und inaktivem Rinderserum sind hier noch nicht berücksichtigt.



mit Immunserum keine Immunkörper mehr. Das kann so erklärt werden, daß unter dem Einflusse des im aktiven Serum vorhandenen Komplementes eine Verfestigung der vorher nur sehr lockeren Bindung zwischen Immunkörper und Cholera-substanz stattfindet, so daß jetzt ein neuer Körper vorliegt, dessen Affinität zum Immunkörper sehr gering oder gleich Null ist. Daraus folgt aber sofort, daß die Bestimmung der Absorption von Immunkörpern aus inaktivem Serum keinen Maßstab für die Affinität zur Bakteriensubstanz abgeben kann, insoweit die Verhältnisse im Tierkörper in Betracht kommen, wo wir im wesentlichen mit aktiven Flüssigkeiten rechnen.

Ohne vorläufig darauf näher einzugehen, sei nur bemerkt, daß sich auf diese Weise erklären läßt, warum die mit inaktivem Serum sensibilisierten Vibrionen aus aktivem Rinderserum viel weniger Immunkörper binden, als aus inaktivem. Denn das Komplement bewirkt allmählich die Verfestigung der lockeren Bindung zwischen Immunkörper und Bakteriensubstanz, und von da an ist eine weitere Immunkörperabsorption unmöglich. Deshalb gelingt es auch, durch Zusatz fremden, komplementhaltigen Serums zu inaktivem Rinderserum während oder nach der Sensibilisierung Rückstände zu erhalten, welche sich genau so verhalten, als ob von vornherein nur aktives Serum angewendet worden wäre.

XXXV. Versuch. 8 Kulturen Cholera werden mit 80 ccm inaktivem Rinderserum  $\frac{1}{2}$  h bei 42° belassen. Hierauf wird die agglutinierte Aufschwemmung in 2 gleiche Teile von je 40 ccm geteilt. Zu der Hälfte a kommen 7 ccm aktives, zu der Hälfte b 7 ccm inaktives Serum eines großen Meerschweinchens. Nach einer weiteren halben Stunde werden die Bakterienmassen (in a fast nur Granula, in b agglutinierte Vibrionen) in je 4 Teile geteilt und gewaschen.

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1) $\frac{1}{4}$ Rückstand aus a + 0,75 ccm inaktives Rinderserum + 0,005 ccm Immunserum | } 1 h 42°;<br>zentrifugiert |
| 2) $\frac{1}{4}$ Rückstand aus a + 0,75 ccm inaktiven Rinderserum + 0,25 ccm NaCl-Lösung |                             |
| 3) $\frac{1}{4}$ Rückstand aus a + 0,75 ccm NaCl-Lösung + 0,005 ccm Immunserum           |                             |
| 4) $\frac{1}{4}$ Rückstand aus a + 1 ccm NaCl-Lösung                                     |                             |
| 5—8) ganz ebenso mit den sensibilisierten Vibrionen der Hälfte b                         |                             |

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 1	+++	+++	+++
„ No. 2	+++	+++	+++
„ No. 3	+++	+++	+++
„ No. 4	+++	+++	++

	0,05 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
von No. 5	+	0	0
„ No. 6	0	0	0—+
„ No. 7	+++	+++	+++
„ No. 8	+++	+++	fast +++
Kontrolle zu 1 und 5	+++	+++	+++
„ „ 2 und 6	+++	+++	fast +++
„ „ 3 und 7	+++	+++	+++
Meerschweinchenkomplement	0—+		

### Zusammenfassung.

1) Cholera vibrionen, welche mit inaktivem Rinderserum sensibilisiert waren, geben die aufgenommenen bakteriolytischen Immunkörper leicht an Kochsalzlösung, Meerschweinchen- und Rattenserum ab.

2) An inaktives Rinder-, Pferde-, Schaf- und Schweineserum geben sie hingegen nicht nur keine Immunkörper ab, sondern nehmen noch solche auf.

3) Sie nehmen aus Kochsalzlösung, Meerschweinchen- und Rattenserum keine immunisatorisch erzeugten Choleraambozeptoren auf, wohl aber aus Rinder-, Pferde-, Schaf- und Schweineserum.

4) Diese scheinbar aviditätssteigernde Wirkung des inaktiven Rinderserums wird durch Behandlung desselben mit Vibrionen nicht vermindert, vielleicht aber durch Erwärmen über 66°.

5) Mit Immunserum sensibilisierte Vibrionen verhalten sich im Prinzip analog den mit normalen Immunkörpern vorbehandelten.

6) Aus aktivem Serum nehmen die mit inaktivem Rinderserum sensibilisierten Vibrionen weit weniger Immunkörper heraus als aus inaktivem, und der Rückstand aus Vibrionen, die mit aktivem Serum vorbehandelt sind, absorbiert überhaupt keine mehr.















Digitized by

Google

Original from  
UNIVERSITY OF MINNESOTA

UNIVERSITY OF MINNESOTA  
biom.per bd.1:originale  
stack no.160

Zeitschrift f ur Immunit atsforschung un



3 1951 002 688 010 0